Lane Medical Library

DE BACTERIOPHAGE LYSIS IN VLOEIBAAR MILIEU

JOH. B. DRENTH

DE BACTERIOPHAGE LYSIS IN VLOEIBAAR MILIEU

DE BACTERIOPHAGE LYSIS IN VLOEIBAAR MILIEU

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE GRONINGEN, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS Dr. J. A. BARRAU, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP ZATERDAG 27 FEBRUARI 1926, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR, DOOR

JOHANNES BERNARDUS DRENTH, Arts
GEBOREN TE NIEUWE-PEKELA

M. DE WAAL — 1926 — GRONINGEN

AAN MIJN AANSTAANDE VROUW.
AAN MIJN OUDERS, ZUSTERS EN BROER.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154010_0030

Bij het voltooien mijner academische studiën rust op mij de aangename taak U, Hoogleeraren en Lectoren der Philosophische en Medische faculteiten te Groningen, mijn hartelijken dank te betuigen voor het onderwijs, dat ik van U heb mogen ontvangen.

Deze dank geldt in het bijzonder U, Hooggeleerde KLEIN, hooggeachte Promotor, die mij bij de samenstelling van dit proefschrift zulk een belangrijke hulp verleend hebt.

Alvorens ik als assistent bij U werkzaam was, genoot ik reeds gastvrijheid op Uw laboratorium en leerde ik de groote welwillendheid kennen, waarmede Gij bereid zijt den beginneling te steunen. Steeds wist Gij in moeilijke oogenblikken door een opwekkend woord de belangstelling gaande te houden. Steeds waart Gij, met Uw uitgebreide kennis en Uw onderzoekmethoden, bereid mij te helpen bij het overwinnen der moeilijkheden. Uwe niet genoeg te waardeeren, aangename leiding bij de onderzoekingen hebben mij het werken op Uw laboratorium tot een waar genoegen gemaakt. Mijn assistenten-tijd zal mij dan ook ongetwijfeld steeds als een aangename herinnering bijblijven, waartoe de goede verstandhouding met het personeel van het laboratorium het hare heeft bijgedragen.

In dankbare herinnering gedenk ik de gestorven Hoogleeraren HAMBURGER en REDDINGIUS.

Ook U, Directeur en Leeraren aan het Gymnasium van het Canisius-College te Nijmegen betuig ik mijn groote erkentelijkheid voor het genoten onderwijs en de vele moeite, die Gij U daarbij gegeven hebt. U, Zeereerwaarde Dr. PIEPERS dank ik bovendien nog voor Uw blijvende belangstelling.

INHOUD.

			Pag.
		Inleiding	1
HOOFDSTUK	I.	Het mechanisme van de bacteriophage lysis in vloeibaar milieu	2
		Literatuur	2
		Onderzoekingen, verricht met de kweekmethode	13
		De microscopische telmethode van Klein	22
		Lytische processen met lagere begintiters	31
		Lytische processen met hoogere begintiters	45
		De microscopische veranderingen der bacteriën tijdens het lysisproces	52
„	II.	Invloed van de bacterie op de bacteriophage lysis in vloeibaar millieu	58
		Sensibiliteit	58
		Toestand van de bacterie	69
		Ouderdom der culturen	78
		Concentratie der bacteriën	79
„	III.	Invloed van de samenstelling van het vloeibaar milieu op de bacteriophage lysis	85
„	IV.	Invloed van zuurstof, filtratie en temperatuur op de bacteriophage lysis in vloeibaar milieu	99
„	V.	Samenvattende beschouwingen	122
		Literatuurlijst	139

INLEIDING.

Onder bacteriophage lysis wordt verstaan het proces, waarbij ontvankelijke bacteriën door een zelfstandig agens (het bacteriophage lysin) gephageerd ($\varphi\alpha\gamma\omega$ = verteren), gelyseerd ($\lambda\upsilon\omega$ = oplossen) worden.

Dit agens wordt door D'HERELLE geïnterpreteerd als te zijn een ultramicrobe, welke op grond van haar werking door hem bacteriophaag wordt genoemd; door de meeste andere onderzoekers wordt het agens niet als een levend organisme opgevat.

Het is een zelfstandig agens, omdat het in het bezit is van een scherp omschreven groep van kenmerken, zooals het vermogen om bacteriën op te lossen, het regenereeren, het overentbaar zijn, het doen optreden van „taches" (leege vlekken) op de agarplaat, enz.

Niet alle soorten van bacteriën, ook niet alle stammen van één en dezelfde soort kunnen gelyseerd worden; zelfs zijn niet altijd alle individuen van één en denzelfden stam onder invloed van het lytisch agens tot oplossing te brengen. Ook kunnen sommige individuen onder den invloed van het bacteriophage lysin resistent worden, hetgeen alsdan gepaard gaat met verschillende morphologische en biologische veranderingen der bacteriën. De lysis, het oplossen, moet dan ook beschouwd worden als één van de veranderingen, welke de bacteriën tengevolge van de inwerking van het bacteriophage lysin kunnen ondergaan.

HOOFDSTUK I.

Het mechanisme van de bacteriophage lysis in vloeibaar milieu.

De fundamenteele proefneming, door D'HERELLE (1) in 1917 gepubliceerd, kan als volgt in het kort worden aangegeven.

D'HERELLE onderzocht dagelijks de faeces van een lijder aan dysenterie, verwekt door den bacil van SHIGA-KRUSE. Hij nam een weinig faeces, wreef deze fijn en bracht deze in een kolfje met sterielen bouillon. Deze troebele massa plaatste hij in een thermostaat bij 37° C. gedurende 18—24 uren. Daarna filtreerde hij de troebele, stinkende en gistende vloeistof door een filter van filtreerpapier, dat met infusoriënaarde geïmpregneerd was. Vervolgens werd het nu helder uitziend filtraat nog eens gefiltreerd, maar nu door een kaars van CHAMBERLAND. Van dit filtraat deed hij 10 druppels in een buisje met bouillon, waarin tevens zooveel SHIGA-bacillen geënt werden, dat de vloeistof juist troebel was; dit buisje werd dan in den thermostaat bij 37° C. gezet. Bij deze dagelijks herhaalde proef zag D'HERELLE, dat steeds na eenigen tijd de bouillon sterker troebel werd wegens den groei van de SHIGA-bacillen. Op zekeren dag werd de bouillon echter niet sterker troebel; integendeel, de aanvankelijk lichte troebelheid was na eenigen tijd geheel verdwenen: de bacillen waren opgelost. Op denzelfden dag was de patiënt veel beter geworden. Deed hij nu enkele druppels van het filtraat van zulk een opgeloste bouilloncultuur bij een versche bouilloncultuur van SHIGA-bacillen, dan werden ook deze bacillen weder opgelost, gelyseerd. Eenige druppels van deze gelyseerde bouilloncultuur waren weder in staat een andere versche bouilloncultuur tot volledige lysis te

brengen. Het lytisch agens bleek dus overentbaar te zijn en in intensiteit van werking te zijn toegenomen.

De dysenteriebacillen, die D'HERELLE gebruikte, nam hij gewoonlijk in zóódanige hoeveelheden, dat per c.c. ongeveer 200—300 millioen kiemen aanwezig waren. Bij zulk een cultuur voegde hij dan filtraat in verschillende hoeveelheden (0.05 c.c., 0.1 c.c. en 0.2 c.c.). Uit elk van deze 3 buisjes nam hij nu tevens, vóórdat deze in den thermostaat geplaatst werden, met een platina-lus iets van deze emulsie en streek gelijkmatig uit op een scheefagarvlakte. Daarna werden de 3 bouillon- en de 3 agarbuisjes, benevens 2 contrôles (een bouillonbuisje en een agarbuisje alleen met SHIGA-bacillen), in den thermostaat bij 37° C. geplaatst. Na eenigen tijd waren dan de 3 bouilloncultuuren met het bacteriophage lysin gelyseerd, terwijl de contrôle-bouillon sterker troebel was geworden. Wat nu de scheefagarbuisjes betreft, hier merkte hij op, dat, terwijl de contrôle-scheefagarcultuur een gelijkmatige, niet onderbroken laag op de agarvlakte vormde, de andere drie agarculturen ook wel veelal een gelijkmatige laag vertoonden, welke echter hier en daar onderbroken was door kleine ronde openingen (leege vlekken); deze openingen waren grooter in aantal, naarmate er meer filtraat was toegevoegd. D'HERELLE noemde deze ronde openingen: „taches stériles" (niet tâches stériles, zooals door sommige Duitsche schrijvers verkeerdelijk geschreven wordt). Deed hij nu bij een SHIGA-bouilloncultuur enkele druppels van het lytisch filtraat en streek hij, nadat het buisje 1, 2, 3 en meerdere uren bij 37° C. gestaan had, één lus van deze emulsie op een scheefagarvlakte uit, dan kreeg hij bv. na een 3-urig verblijf bij 37° C. veel meer „taches" dan na een 1-urig verblijf. Dus ook hieruit bleek, volgens D'HERELLE, dat het lysin zich vermeerderde.

D'HERELLE (2, 3) had dus gevonden, dat het lysin overentbaar was en filtreerbaar, zich vermeerderde en op agar „taches" vormde. Hij was van meening, dat het lytisch agens een ultramicrobe moest zijn en gaf deze den naam van: Bacteriophagum intestinale D'HERELLE 1918.

Wat nu speciaal het lysisproces in vloeibaar milieu betreft,

deelt D'HERELLE (4, 5, 6) nog in hoofdzaak het volgende mede:

1. Voor het tot stand komen der lysis is noodig, dat er jonge, levende bacteriën aanwezig zijn. Het milieu moet ook voedingsstoffen voor de bacteriën bevatten en de temperatuur moet voor groei geschikt zijn.

2. Omtrent het mechanisme van het proces zelf meent D'HERELLE door directe microscopische waarneming en ook proefondervindelijk te hebben aangetoond, dat de bacteriophaag in de bacteriën dringt en dan in het bacteriënplasma in 1—1½ uur een kolonie van 15—25 elementen doet ontstaan. De bacterie zou daarop uit elkander vallen, waarna de jonge bacteriophagen vrij komen.

a. Het binnendringen van den bacteriophaag in de bacteriën meent hij microscopisch te hebben waargenomen: kleine schitterende puntjes gaan door het membraan in de bacterie. (Verreweg de meeste onderzoekers hebben dit binnendringen niet kunnen constateeren). Dat de bacteriophaag inderdaad in de bacteriën dringt, wordt volgens hem nader bevestigd door het feit, dat in het begin van het proces de bacteriophaag uit de vloeistof verdwijnt, hetgeen blijkt uit door hem genomen centrifugeerproeven. Indien hij een SHIGA-bouilloncultuur met bacteriophaag lysin eenigen tijd na toevoeging van het bacteriophage lysin centrifugeerde, kon in de bovenstaande vloeistof geen of weinig bacteriophaagwerking meer aangetoond worden. Indien hij nu bouillon met evenveel bacteriophaag lysin, zonder SHIGA-bacillen, centrifugeerde, dan kon in de bovenstaande vloeistof eveneens een vermindering van bacteriophage werking aangetoond worden, maar niet in zulk een sterke mate als in het buisje, waaraan ook SHIGA-bacillen waren toegevoegd.

b. De vorming van 15—25 elementen in de bacterie meent hij microscopisch te hebben waargenomen. Bovendien is D'HERELLE van meening zulks met zijn telmethode te hebben kunnen vaststellen. Elke „tache" op de agarvlakte bestaat namelijk volgens hem uit een kolonie bacteriophagen en zooals men met de plaattelmethode van KOCH het aantal bacteriën bepaalt op grond van het beginsel „elke kolonie ontstaat uit één bacterie", meent ook

D'HERELLE met het bepalen van het aantal „taches" het aantal bacteriophagen te hebben vastgesteld. Uit de toepassing van deze telmethode, welke tijdens het proces uitgevoerd werd, heeft hij afgeleid, dat er in 1—1½ uur 15—25 bacteriophagen gevormd worden. (Op deze telmethode van D'HERELLE heeft o.a. H. v. PREISZ (43) scherpe critiek uitgeoefend).

c. D'HERELLE is van meening, dat hij er in geslaagd is door herhaalde overenting van een gelyseerde bouilloncultuur op een versche SHIGA-bouilloncultuur de „virulentie" te verhoogen. Vooral was dit volgens hem te constateeren, indien een „zwakke" bacteriophaag toegevoegd werd. Deze was aanvankelijk in de SHIGA-bouilloncultuur aanwezig zonder lysis te veroorzaken. Door uit zulk een cultuur op een scheefagarvlakte over te enten, kon uit het optreden van „taches" de aanwezigheid van den „zwakken" bacteriophaag aangetoond worden. Een dusdanige SHIGA-bouilloncultuur, waarin de bacteriophaag aanwezig was, werd gefiltreerd en met het filtraat werden de overentingen verricht. Na herhaalde overentingen gelukte het met enkele druppels van het filtraat van de laatste overenting een totale lysis van een versche SHIGA-bouilloncultuur te verkrijgen. De bacteriophaag had alsdan volgens D'HERELLE een „virulentieverhooging" ondergaan. (Het is evenwel de vraag of hier wel van een „virulentieverhooging" gesproken mag worden; o.i. is dit verloop niet zoozeer als een verandering in qualitatieven zin, dan wel veeleer als een verandering in quantitatieven zin op te vatten, want D'HERELLE constateerde door zijn telmethode een vermeerdering van het aantal „taches").

3. De bacteriën worden bij het lytisch proces volgens D'HERELLE totaal opgelost. Hij grondt dit o.a. op het microscopisch onderzoek. Bij een druppel SHIGA-bouilloncultuur met den bacteriophaag voegde hij GIEMSA-oplossing. Na 15 minuten zag hij nog alleen normale SHIGA-bacillen; na 45 minuten was 10 % der individuen slecht kleurbaar; na 1—2 uur werden de bacillen qualitatief en quantitatief nog slechter gekleurd; ten slotte kon hij niets meer van de bacillen waarnemen. Een dergelijk oplossen zonder overblijfselen kan in laatste instantie niet anders verklaard worden

dan door een fermentwerking; D'HERELLE neemt aan, dat een dergelijk ferment afkomstig is van den bacteriophaag.

Later deelt D'HERELLE (7) mede, dat de bacillen onder invloed van den bacteriophaag eerst opzwellen, kogelrond worden en daarna plotseling bersten, waarbij een aantal korrels vrij komen, die ten slotte alle opgelost worden.

4. Het was ook reeds aan D'HERELLE bekend, dat de actie niet absoluut is ten opzichte van alle bacillen, die in de cultuur aanwezig zijn. Vaak blijven er nog — ook wanneer de cultuur volkomen helder geworden is — levende bacillen over. Deze gaan zich later weer vermeerderen en maken aldus den bouillon weer troebel. Deze cultuur wordt door D'HERELLE „culture secundaire" genoemd. A. DEBRÉ en HAGUENAU (8) verkondigden in 1920 de meening, dat er altijd een secundaire cultuur ontstaat en de actie dus nimmer absoluut is ten opzichte van alle bacillen.

Verschillende andere onderzoekers hebben zich eveneens met het mechanisme van het lysisproces in vloeibaar milieu bezig gehouden.

Zoo deelden in 1921 J. BORDET en M. CIUCA (9) een methode mede, om de regeneratie van het bacteriophage lysin aan te toonen. Hun methode berustte op het maken van 2 seriën van verdunningen (serie A en serie B). Elke serie bestond uit 7 buisjes, welke ieder 7 c.c. bouillon bevatten. Aan het eerste buisje (van elke serie) werd één druppel lysaat (d.w.z. door het bacteriophage lysin opgeloste bouilloncultuur) toegevoegd; uit dit eerste buisje werden 2 druppels overgebracht in een 2e buisje en zoo vervolgens 2 druppels uit het 2e buisje in een 3e buisje, enz. Aldus bestond elke serie uit 7 buisjes, waarin het lysaat in verschillende verdunningen aanwezig was. Daarna werd in elk buisje van beide seriën één druppel bacteriënsuspensie gebracht. Na 24 uren zagen zij, dat de eerste 3 buisjes van beide seriën totaal helder geworden waren; het 4e buisje was niet geheel opgehelderd en de andere 3 buisjes waren sterk troebel. Het 4e buisje gaf dus de grens aan van de verdunning, waarbij nog lytische werking aangetoond kon worden. Deze grens was in beide seriën dezelfde. Zij voegden nu bij het 4e buisje van serie

A één druppel bacteriënsuspensie en bij het 4e buisje van serie B één druppel lysaat. Na 5 dagen werden beide buisjes gedurende $^1/_2$ uur op 58° C. verhit, om alle eventueel nog aanwezige levende bacillen te dooden. Daarna werden beide buisjes onderzocht op de intensiteit der lytische werking volgens de zoo juist aangegeven verdunningsmethode. Zij zagen nu, dat het 4e buisje van serie A even sterk lytisch werkte als het onverdunde lysaat, waarvan zij uitgegaan waren. Daarentegen was in het 4e buisje van serie B geen verandering gekomen: van de verdunningen was geen enkel buisje gelyseerd. De toevoeging van sensibele bacillen in het 4e buisje van serie A had derhalve gevoerd tot een toeneming van het bacteriophage lysin of, zooals Bordet en Ciuca het uitdrukken, tot een regeneratie van het lytisch princiep.

Op grond van hun verdere onderzoekingen, waarbij zij wisselende uitwendige omstandigheden toepasten (toevoeging van antiseptica, wijziging van milieu), kwamen zij tot de conclusie, dat de lytische werking en de regeneratie van het bacteriophage lysin elkander steeds begeleiden.

Bordet en Ciuca spraken voorts het vermoeden uit, dat aan de lysis steeds een phase van vermeerdering der bacteriën voorafgaat. Er moet eerst een periode van actief leven zijn geweest, voordat de micro-organismen opgelost worden. Zij gaven te kennen, dat zulks moeilijk te bewijzen is, maar het meest met hun observaties overeenkomt.

De door Bordet en Ciuca gevolgde verdunningsmethode is de basis geworden, waarop Appelmans zijn titreermethode van het bacteriophage lysin fundeerde.

Volgens de meening van W. Seiffert (10) kan de conclusie van Bordet en Ciuca, dat de lytische werking en de regeneratie van het bacteriophage lysin elkander steeds begeleiden, wel juist zijn, doch de intensiteit is bij beide processen niet dezelfde: de lytische werking en de toeneming van het bacteriophage lysin loopen niet parallel. Wèl zijn beide processen afhankelijk van één zelfde moment, namelijk van de sensibele bacteriën. Seiffert zag echter, dat er bij verschillende passages een uiteenloopende

intensiteit van toeneming van het bacteriophage lysin te voorschijn kon komen. De oorzaak hiervan nu moet volgens W. SEIFFERT toegeschreven worden aan de bacteriën. De wanverhouding van lytische werking en vermeerdering van het bacteriophage lysin kan volgens hem op drieërlei wijze verklaard worden:

a. Door langzame vermeerdering van de bacteriën. Deze mogelijkheid wordt door hem ontkend, want hij zag na 6 uren den bouillon duidelijk troebel worden. (Tellingen of generatieduurbepalingen heeft hij niet verricht, ofschoon hij alleen langs deze wegen zekerheid had kunnen verkrijgen).

b. Door verworven lyso-resistentie; de bacteriën zouden moeilijker oplossen, naarmate zij ouder zijn en dit ouder worden zou bij den eenen stam vroeger kunnen optreden dan bij den anderen stam. Deze mogelijkheid klinkt a priori al zeer onwaarschijnlijk, maar ook SEIFFERT verwerpt haar, omdat hij na één uur bij alle passages hetzelfde beeld te zien kreeg en hij geen vroegtijdige resistentie kon waarnemen.

c. Doordat de bacteriën wèl gemakkelijk worden opgelost, maar bij de lysis slechts geringe hoeveelheden lysin vrij komen; deze mogelijkheid acht hij de juiste.

Uit het feit o.a., dat ook de vermeerdering der bacteriën niet parallel loopt met de toeneming van het bacteriophage lysin, komt SEIFFERT (11, 12, 13, 14, 15) tot de conclusie, dat het ontstaan van het lysin als een afzonderlijke functie van de bacteriën opgevat moet worden.

Over het verband tusschen de toeneming van het aantal bacteriën, het oplossen der bacteriën, en de vermeerdering van het bacteriophage lysin hebben vooral R. DOERR (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22) en zijn medewerkers meer uitvoerige en dieper gaande studies gemaakt.

DOERR (17) geeft op grond van zijn onderzoekingen de volgende omschrijving van de bacteriophagie: „Bacteriophagie is het verschijnsel, waarbij bepaalde bacteriën juist in de phase van levendige stofwisseling en voortschrijdende vermeerdering snel opgelost en vernietigd worden en wel door adialysabele, bacteriënfilters passeerende, thermolabiele stoffen, welke in hoeveelheid (con-

centratie) tijdens de door deze stoffen veroorzaakte bacteriolyse snel toenemen."

In een eerste artikel van R. Doerr en W. Grüninger (16) wordt medegedeeld, hoe zij de verhouding van de hoeveelheid lysin tot de vermeerdering en afsterving der bacteriën op verschillende tijdstippen van het lytisch proces bestudeerden. Zij gingen bij hun proefnemingen in het algemeen als volgt te werk.

In een Erlemeyerkolf werden 200 c.c. steriele bouillon gebracht ($P_H = 7.65$); de kolf werd daarna in een waterbad van 37° C. geplaatst. In deze kolf brachten zij nu het bacteriophage lysin. Onmiddellijk daarna werd de titer bepaald van het bacteriophage lysin volgens de verdunningsmethode van Appelmans en uitgedrukt in de lysin-exponenten volgens A. Werthemann. Er werd nu zooveel lysin in de kolf gebracht, dat de titer 1 of 2 bedroeg. Als lysaat gebruikten zij bouillon, waarin door toevoeging van het bacteriophage lysin (coli-lysin) en sensibele bacteriën (coli-bacteriën) het lysisproces tot stand gekomen was; zulk een lysaat werd te voren gedurende 1 uur bij 57° C. verhit, om alle eventueel nog aanwezige levende bacteriën te dooden. Daarna brachten zij één lus van een 16-urige coli-bouilloncultuur in de kolf, die dan weder in het waterbad van 37° C. geplaatst werd. Van tijd tot tijd werd nu vloeistof uit de kolf genomen en onderzocht op het gehalte aan levende bacillen door middel van de gelatine-plaatmethode. Zij gingen derhalve van de veronderstelling uit, dat alle levende bacteriën in den gelatine-voedingsbodem, ondanks de aanwezigheid van het bacteriophage lysin, aanleiding geven tot het doen ontstaan van koloniën.

Doerr en Grüninger meenen nu uit hun proefnemingen het volgende te kunnen vaststellen:

1. Het initiaal aantal bacteriën en de lytische titer veranderen niet gedurende den tijd, welke beantwoordt aan het incubatie-stadium van den bacteriëngroei in versch geënten bouillon; de groei-incubatieperiode schijnt ook niet verlengd te zijn.

2. Is de bacteriëngroei eenmaal begonnen, dan blijft aanvankelijk de lysinhoeveelheid onveranderd; daarna begint het lysin-

gehalte te stijgen, welke stijging coïncideert met een snelle toeneming van het aantal bacteriën. Deze toeneming van het aantal bacteriën blijft gedurende de geheele phase van lysinstijging aanhouden.

3. Zoodra de lysin-titer het maximum bereikt heeft, wordt het afsterven der bacteriën sterker dan de vermeerdering: vermindering alsdan van het aantal bacteriën.

4. In de laatste phase van het tot sterilisatie voerend bacteriënverval komt geen lysinverhooging; de lysin-titer blijft constant, soms zelfs komt er een daling.

5. De toeneming van het lysin geschiedt continu en niet trapsgewijs, zooals D'HERELLE meent.

6. De incubatieperiode van de lysinstijging ontbreekt en de toeneming van het bacteriophage lysin sluit zich onmiddellijk aan bij de bacteriënproliferatie, indien men de initiale lysinquantiteit eerst in de phase van de voortschrijdende bacteriënvermeerdering toevoegt. De bacteriënvermeerdering of een moment, daarvan afhankelijk, is dus de oorzaak van het wegvallen van de phase der lysinlatentie. De maximale titer komt op denzelfden tijd tot stand als bij gelijktijdige samenvoeging van bacteriën en bacteriophaag lysin. Derhalve: bacteriëngroei en lysinstijging staan wel met elkander in verband, maar loopen niet parallel.

7. Binnen de eerste 3 uren na de bacteriëntoevoeging komt de bacteriënvermeerdering, zoowel in lysin-vrijen als in lysinhoudenden bouillon, in eenzelfde tempo tot stand. Het schijnt derhalve, dat het bacteriophage lysin de bacteriën niet direct kan laedeeren, althans niet bij titer 1 of 2.

8. Het lysin neemt toe, voordat het tot een aantoonbaar en de norm overtreffend bacteriënverval gekomen is. Daarom kan volgens hen de aanleiding tot lysinvermeerdering niet gezocht worden in een abnorm sterk bacteriënverval.

9. De bacteriolyse begint, zoodra de lysinconcentratie een bepaalde waarde (titer 5) bereikt heeft.

Op grond van hun onderzoekingen beschouwen DOERR en GRÜNINGER het bacteriophage lysin niet als een levend agens,

doch als een groeihormoon van de bacteriën, telkens weer ontstaande tijdens het deelingsproces dier bacteriën.

Een jaar later, in 1923, publiceerde een andere medewerker van DOERR, nl. H. MEULI (19), verdere onderzoekingen over het mechanisme van het lysisproces. MEULI vond, dat de lysin-productie altijd bij eenzelfde drempelwaarde blijft staan; de toeneming van het bacteriophage lysin heeft steeds een constante bovengrens, onafhankelijk van het aantal toegevoegde bacteriën: de school van DOERR spreekt hier van de wet van MEULI. Het lysin ontstaat ook volgens hem niet uit bacteriënvervalproducten. Bij lagere beginconcentraties van het bacteriophage lysin zouden andere processen tot stand komen dan bij hoogere. MEULI verwondert er zich over, dat bij een lagere titer de bacteriën op de gewone wijze doorgroeien, terwijl toch een inwerking, zij het een quantitatief geringere, verwacht mocht worden.

C. SCHUURMAN (23) deelt in zijn fraai, overzichtelijk werk ten aanzien van het mechanisme van het lysisproces nog mede, dat de bacteriën onder den invloed van het bacteriophage lysin zich sneller deelen. Dit wordt afgeleid uit de troebelheid der culturen, welke troebelheid op een zelfde tijdstip sterker is dan die van contrôle-culturen van SHIGA-bacillen zonder lysin.

Behalve lysis, lysinstijging en vermeerdering der bacteriën werd ook nog een ander moment van het mechanisme van het lysisproces nagegaan en wel door K. VON ANGERER (24, 25), nl. de kwestie van de binding van het lysin aan de bacteriën. De proefnemingen (centrifugeerproeven) toonden aan, dat de binding in enkele seconden tot stand komt; een dergelijke momentane binding wordt algemeen aangenomen. Voor binding moet er eerst contact zijn en een snel contact ligt niet zoo voor de hand, aangezien het volumen van alle bacteriën te zamen slechts een gering deel vormt van het vloeistofvolumen; derhalve zou men juist een langzame binding mogen verwachten. Hoe is nu die snelle binding te verklaren, vraagt VON ANGERER zich af. Uitgaande van de opvatting, dat het bacteriophage lysin een corpusculair element is en een grootte bezit van 20$\mu\mu$, zooals door C. PRAUSNITZ (44) door middel van de HAËN'sche membraanfilters vast-

gesteld werd, berekent VON ANGERER de kans van botsing van bacterie en bacteriophaag lysin; hij komt tot de conclusie, dat elk kwartier één corpusculair lytisch deeltje tegen één bacterie zou botsen. Op deze wijze is dus de snelle binding niet te verklaren. Evenmin kan een actieve, biologische eigenbeweging der betreffende corpusculaire deeltjes een aannemelijke voorstelling geven. Ook een tegengestelde electrische lading kan niet de oorzaak van de snelle binding zijn, want zoowel het bacteriophage lysin als de bacteriën gaan naar de anode. Hij komt dan ook tot de conclusie, dat voor de snelle binding nog geen verklaring te vinden is.

Sommige onderzoekers gingen in het bijzonder na, hoever de afbraak der bacteriën zich uitstrekte.

GRATIA (26) deelde in 1921 mede, dat de coagulase, die door staphylococcen geproduceerd wordt, ook nog aanwezig blijkt te zijn in een gefiltreerde, door bacteriophaag lysin opgeloste bouilloncultuur; de coagulase was derhalve door het lytisch proces niet aangetast.

Volgens D'HERELLE (6) wordt het toxin van den SHIGA-bacil bij het lysisproces niet vernietigd en kunnen door een opgeloste bouilloncultuur nog wel complementbindende antilichamen gebonden worden.

Ook J. DE NECKER (27) vond in lysaatbouillon complementbindende antigenen en tevens praecipitinogenen aanwezig.

TORAKO IKOMA (28) constateerde echter, dat agglutininen niet meer gebonden worden, indien de bacteriën door het lysin opgelost zijn. Derhalve moet volgens hem de eiwitafbraak wel diep ingrijpend zijn, omdat de agglutinogene functie aan de eiwitlichamen gebonden is.

Behalve langs experimenteelen weg is het mechanisme van het lysisproces door enkele onderzoekers ook nog microscopisch bestudeerd.

Vooral A. SEISER (29) heeft zich hiermede bezig gehouden. Hij zag o.a. het volgende verloop:

In het begin: een dun, middelmatig lang staafje.

Na 15 min.: een beginnende protoplasmaverdichting aan de polen.

Na 35 min.: een duidelijke protoplasmaverdichting aan de polen.
Na 55 min.: deeling, polaire verdichting der dochtercellen.
Na 60 min.: bleekere teekening, overgang tot spoelvorm.
Na 65 min.: één dochtercel is verdwenen.
Na 70 min.: óók de andere dochtercel is verdwenen.

SEISER vond bij alle staafjes, die hij waarnam, een toegenomen grootte met opzwelling tot spoelvorm. Tevens meende hij te kunnen concludeeren, dat, wanneer de lysis optreedt, alle bacteriën, hetzij zij verkeeren in den toestand vóór, nà of tijdens het deelingsstadium, plotseling vernietigd worden; m.a.w., de celdeeling is volgens hem voor de lysis geen vereischte. Wèl is de lysis gebonden aan het leven en de groeimogelijkheid van de bacteriëele cel, zooals hij met BAIL, DOERR e.a. aanneemt.

Ook E. WOLLMAN (30) onderzocht het mechanisme van het lysisproces langs microscopischen weg. Hij vond, dat de bacteriën eerst een ovalen vorm aannamen en veel grooter werden dan normaal. Eenigen tijd daarna werd de inhoud van de bacterie korrelig en werden de contouren vaag; tenslotte was er niets meer van de bacteriën waar te nemen. Aanvankelijk was hij van meening, dat de spoelvormen, welke tijdens het lysisproces optreden, te voorschijn geroepen worden door een drukverhooging in het inwendige van de bacteriëele cel als gevolg van een verandering van den celwand. Nadat hij echter zulke spoelvormen in gedistilleerd water had gebracht, bleek hem, dat de vorm der bacterie daardoor niet veranderde. Behalve in ongekleurden toestand, onderzocht hij de bacteriën tijdens enkele phasen van het lysisproces ook door middel van met GIEMSA-oplossing gekleurde praeparaten; hierbij nam hij evenals D'HERELLE waar, dat de bacteriën hoe langer hoe minder kleurbaar werden.

* * *

Het bacteriophage lysin, waarmede onze proefnemingen verricht zijn, werd geïsoleerd uit de faeces van een kip. Het lysin bleek

monovalent te zijn en alleen te werken op den dysenteriebacil van SHIGA-KRUSE. Alvorens met dit lysin te experimenteeren, werd nauwkeurig nagegaan, of onze SHIGA-cultuur vrij was van het bacteriophage lysin en niet spontaan, zonder toevoeging van het bacteriophage lysin, lysis kon verwekken. De SHIGA-cultuur bleek volgens de vele malen herhaalde proeven lysin-vrij of, zooals FLU dit uitdrukt, „ultrarein" te zijn.

Voor de bepaling van de sterkte van het bacteriophage lysin werd de methode van APPELMANS—WERTHEMANN (78, 166) toegepast. Met een steriele pipet wordt 1 c.c. van het lysaat bij 9 c.c. bouillon gevoegd en flink geschud (zonder schuimvorming). Met een andere steriele pipet (bij het maken van elke verdunning moet een nieuwe, steriele pipet gebruikt worden) neemt men 1 c.c. van deze eerste verdunning en voegt deze toe aan een tweede buisje met 9 c.c. bouillon en na goed schudden brengt men weder 1 c.c. van deze tweede verdunning in een derde buisje, enz., totdat men denkt voldoende verdund te hebben. Men merkt dan de buisjes volgens de verdunningstiter met 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, enz. Daarna wordt bij elk buisje een gelijke hoeveelheid (2 druppels of $^1/_{10}$ c.c.) eener 16—24-urige SHIGA-bouilloncultuur gevoegd. Vervolgens worden al deze buisjes bij 37° C. geplaatst. Na 3, 6, 12 en 24 uren worden deze buisjes onderzocht en nagegaan, of er een tijdelijke of blijvende, geheele of gedeeltelijke lysis is ingetreden. De titer wordt aangegeven door het laatste buisje, waarin totale opheldering wordt waargenomen. Nemen wij aan, dat dit het 10e buisje is, d.w.z. het buisje, dat gemerkt is met 10^{-10}, dan wordt, overeenkomstig het voorstel van WERTHEMANN, de titer aangeduid door den exponent met weglating van het minusteeken, in dit geval dus door 10.

Volgens deze methode bleek de titer van ons bacteriophaag lysin 10 (tot 11) te bedragen. Indien de titer naderhand bij bewaren of anderszins een daling onderging, kon door eenige overentingen weer gemakkelijk de sterkte van de titer tot 10 opgevoerd worden.

Als milieu werd de voedingsbouillon van LÖFFLER gebezigd, bestaande uit Liebig's vleeschextract 1 %, pepton 1 %, keukenzout

$^1/_2$ % en zooveel natronloog, dat een zwak-alcalische reactie ($P_H = 7.2$) resulteerde.

Waar niet anders vermeld is, verliep het proces bij aanwezigheid van zuurstof, in het donker en bij 37° C.

De bepaling van het aantal kweekbare bacteriën geschiedde met de Koch'sche plaatmethode. Als voedingsbodem werd de gewone 2 %-voedingsagar-agar genomen; door het bezigen van den agar-voedingsbodem konden de platen bij 37° C. geplaatst worden, waardoor een optimale temperatuur voor den groei van de SHIGA-bacillen verkregen werd. De platen werden zoodanig gemaakt, dat van de te onderzoeken vloeistof (ev. 10- of 100-voudig verdund) één platina-lus werd overgebracht in ongeveer 2 c.c. steriele, physiologische NaCl-oplossing, in een steriel reageerbuisje aanwezig; daarna had toevoeging plaats van den gesmolten en tot 45° C. afgekoelden voedingsagar-agar. Na goed schudden werd de inhoud van het buisje in een steriele PETRI-schaal uitgegoten. Steeds werden op deze wijze 2 platen gemaakt. De platen werden bij 37° C. geplaatst en na 24 uren geteld.

Kolven met 200 c.c. bouillon werden te voren in een thermostaat bij 37° C. gezet, ten einde den bouillon dezen temperatuurgraad te doen aannemen. Aan deze kolven werden verschillende hoeveelheden lysaatbouillon toegevoegd, zoodanig, dat door de verdunning de begintiters in de verschillende kolven uiteenloopende waarden bereikten (nl. 1, 2 en 4). Vervolgens werden aan de kolven bepaalde hoeveelheden ($^1/_2$ c.c. of 5 c.c.) van een 18-urige SHIGA-bouilloncultuur toegevoegd. Na goed geschud te hebben, werd uit de kolven ruim 1 c.c. vloeistof voor het eerste onderzoek genomen en werden de kolven daarna weder bij 37° C. gesteld.

Deze uit de kolven genomen vloeistof diende voor de titerbepaling en voor het gieten van de agarplaten. Op deze wijze werd onmiddellijk na de samenvoeging van het bacteriophage lysin en de bacteriën de lysin-titer en het aantal kweekbare bacteriën vastgesteld. Nadat de kolven 30, 60, 90, 120 minuten, enz. bij 37° C. gestaan hadden, werden geheel op dezelfde wijze de titer en het aantal kweekbare bacteriën bepaald.

TABEL I.

200 c.c. bouillon + $^1/_2$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 2 c.c. lysin (titer 3).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën.		Troebelheid.	Lysin-titer.
	per lus.	per $^1/_{10}$ c.c.		
0	686	16460	+	< 1
30	876	32538	+	1
60	470	28671	+	0
90	720	30624	+	0
120	1240	40194	++	0
150	1260	50592	+++	0
180	2897	153120	++++	
210	3828	ontelbaar	+++++	
240	7650	ontelbaar	+++++	2
270	21	821	+++++	3
315	6	14	+++	3
360	0	29	+++	3
24 uren			++++++	

TABEL II.

200 c.c. bouillon + $^1/_2$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 3).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën.		Troebelheid.	Lysin-titer.
	per lus.	per $^1/_{10}$ c.c.		
0	640	17618	+	1
45	920	30640	+	1
105	1440	45960	++	2
135	1915	65110	+++	2
180	7660	65493	+++++	3
210	5745	5745	+++++	3
240	156	12	++++	4
300	4	21	0	4
345	3	43	0	5
390	3	82	0	5

0 : volkomen helder.
+ : geringe troebelheid.
++ : matige troebelheid.
+++ : sterke troebelheid.
++++ : zeer sterke troebelheid, enz.

TABEL III.

200 c.c. bouillon + $^1/_2$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 3).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën		Troebelheid.	Lysin-titer.
	per lus.	per $^1/_{10}$ c.c.		
0	640	42130	+	1
45	880	49390	+	1
105	2940	85110	+++	1
135	8043	ontelbaar	+++++	2
180	9958	ontelbaar	+++++	3
210	644	51	+++++	3
240	29	20	+++++	4
300	2	52	0	5
345	6	120	0	5
390	18	440	0	5
24 uren	240	900	0	9

TABEL IV.

200 c.c. bouillon + $^1/_2$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 2 c.c. lysin (titer 5).

Tijd (minuten)	Aantal kweekbare bacteriën per $^1/_{10}$ c.c.	Troebelheid.	Lysin-titer.
0	22214	+	2—3
60	27193	+	3
120	61280	+++	2
180	10341	+++++	4
240	75	+++	5
270	22	0	5
300	7	0	5
360	20	0	5
420	0	0	6
30 uren	0	0	

TABEL V.

200 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 2 c.c. lysin (titer 6).

Tijd (minuten)	Aantal kweekbare bact. per lus.	Troebelheid.	Lysin-titer.
0	18757	++	4
30	11484	++	4
60	19140	+++	3
90	11484	+++	6
120	48	+++	7
150	4	0	6
180	0	0	7
210	1	0	6
240	0	0	6
270	0	0	7
24 uren	0	0	10

Kweekbare bacteriën. Het verloop van het aantal kweekbare bacteriën kan in 2 perioden verdeeld worden. In de eerste periode wordt een toeneming van het aantal kweekbare bacteriën tot een zeker maximum en in de tweede periode een zeer snelle vermindering van het aantal kweekbare bacteriën waargenomen.

De toeneming van het aantal kweekbare bacteriën in de eerste periode geschiedt regelmatig. Deze periode duurt bij een lagere begintiter langer dan bij een hoogere begintiter. Bij een begintiter kleiner dan 1 (Tabel I) duurt deze periode 240 minuten, bij een begintiter 1 is de duur 180 minuten (Tabellen II en III), bij begintiter 2—3 duurt zij 120 minuten (Tabel IV) en bij begintiter 4 (Tabel V) 60 minuten. Naarmate de begintiter hooger is, wordt het maximum aantal kweekbare bacteriën, dat bereikt wordt, relatief kleiner. In Tabel I met een begintiter kleiner dan 1, is het maximum aantal veel grooter dan 150000 en in Tabel IV, met begintiter 2—3, is het maximum slechts 61280, terwijl het beginaantal in Tabel IV nog grooter is. Een vergelijking van Tabellen II en III met (per platina-lus) een maximum aantal kweekbare bacteriën, dat minstens het 10-voudige is van het

beginaantal, met Tabel V, waar het maximum slechts zeer weinig hooger is dan het beginaantal, toont dit ook al zeer duidelijk aan.

In de tweede periode geschiedt de daling van het aantal kweekbare bacteriën zeer snel. In Tabel I ziet men in 30 minuten een daling van 7650 tot 21 tot stand komen; in Tabel II in 60 minuten van 7660 tot 156; in Tabel III in 30 minuten van 9958 tot 644; enz. Opmerkelijk is, dat in Tabellen I, II en III, waar het aantal kweekbare bacteriën zoowel per lus als per $^1/_{10}$ c.c. bepaald werd, het eerste aantal relatief veel grooter is dan het aantal, dat per $^1/_{10}$ c.c. vastgesteld werd. In proefneming II werden bv. per $^1/_{10}$ c.c. na 240 minuten 12 koloniën geteld en per lus 156 en in proefneming III na 210 minuten 51 per $^1/_{10}$ c.c. en 644 per lus. De platina-lus, die gebruikt werd bij deze proefnemingen, kon 1 mgr. gedistilleerd water bevatten, zoodat dus gerekend kan worden, dat het aantal bacteriën per $^1/_{10}$ c.c. ongeveer het 100-voudige van het aantal per lus diende te zijn. De oorzaak van deze afwijking moet hieraan toegeschreven worden, dat per $^1/_{10}$ c.c. een grootere hoeveelheid lysin wordt overgebracht en in de agarplaat doorwerkt. Bij deze onderzoekingen werden dan ook de platen, om deze fout zooveel mogelijk te vermijden, in hoofdzaak met zeer kleine hoeveelheden van de vloeistof gemaakt.

Na de vermindering van het aantal kweekbare bacteriën ziet men bij lagere begintiters (Tabellen I, II en III) weer vrij spoedig een zeer geringe, maar duidelijke en voortschrijdende toeneming van het aantal bacteriën voor den dag treden. In Tabellen II en III o.a. begint deze toeneming na 300 tot 390 minuten. De agarplaten, in deze periode gegoten, vertoonen koloniën van abnormale vormen, welke koloniën uit bacillen bestaan, die resistent zijn tegen het bacteriophage lysin Deze langzame toeneming voert derhalve tot het optreden van de door D'HERELLE zoogenoemde „culture secundaire."

Troebelheid. Tijdens de toeneming van het aantal kweekbare bacteriën neemt de troebelheid regelmatig toe. Merkwaardig is echter, dat bij het begin van de snelle daling (begin van de tweede periode) de troebelheid niet onmiddellijk vermindert, soms

zelfs aanvankelijk nog toeneemt. In Tabel I ziet men na 240 minuten een daling van 7650 per lus tot op 21 per lus na 270 minuten, terwijl de troebelheid dezelfde blijft. In Tabel II ziet men een zelfde troebelheid na 180 minuten en na 210 minuten, terwijl het aantal bacteriën daalde van 65493 per $^1/_{10}$ c.c. tot op 5745. In Tabel IV kan men opmerken, dat het aantal bacteriën na 120 minuten 61280 bedraagt en na 180 minuten 10341, terwijl de troebelheid na 180 minuten nog intensiever geworden is. In Tabel V is het aantal bacteriën na 90 minuten 11484 en na 120 minuten 48; de troebelheid werd na 120 minuten even sterk gevonden als na 90 minuten. De intensieve troebelheid, welke zich vertoont tijdens en na de snelle daling, kan derhalve niet geheel verklaard worden uit het aantal kweekbare bacteriën. Ongeveer 60 tot 120 minuten na het begin van de snelle daling van het aantal bacteriën wordt de troebelheid geringer en zeer korten tijd daarna wordt de vloeistof volkomen helder. In Tabel III bv. begint de snelle daling na 180 minuten en na 300 minuten is de vloeistof reeds volkomen helder geworden. In Tabel IV begint de daling van het aantal bacteriën na 120 minuten; de troebelheid neemt af van 180 tot 240 minuten en na 270 minuten is er volkomen helderheid opgetreden.

Na langeren tijd komt, in het bijzonder bij een lagere begintiter, opnieuw een troebelheid door vermeerdering van resistente kiemen („culture secundaire").

Lysin-titer. In den aanvang blijft de titer dezelfde, terwijl reeds een toeneming van het aantal bacteriën is opgetreden. Vervolgens stijgt de lysin-titer, niet alleen totdat het maximum aantal bacteriën bereikt is, maar ook nog daarna. In Tabel II is na 180 minuten het maximum aantal kweekbare bacteriën te vinden; de titer bedraagt op dat moment nog slechts 3, terwijl deze na 345 minuten reeds tot 5 gestegen is. In Tabel III is eveneens het maximum aantal bacteriën na 180 minuten aanwezig, de titer is dan 3, terwijl na 24 uren de titer op 9 bevonden wordt. In Tabel V is op het moment van de aanwezigheid van het maximum aantal bacteriën de titer 3; na 24 uren wordt titer 10 geconstateerd.

Ook na volledige lysis blijft in deze proefnemingen de titer nog stijgen; in Tabel II wijst de titer bij de volledige lysis 4 aan, terwijl 45 minuten later de titer reeds 5 bedraagt; in Tabel III is de titer bij volledige lysis 5 en na 24 uren is de titer tot 9 gestegen; in Tabel V gaat de lysis gepaard met een titer 6 à 7, terwijl na 24 uren de maximale titer 10 bereikt wordt. De maximale titer wordt derhalve in deze proefnemingen niet tegelijk met of onmiddellijk na de lysis bereikt.

De titerstijging gaat continu; alleen in een tweetal der experimenten (Tabellen IV en V) ziet men duidelijk eenigen tijd na het bereiken van het maximum aantal kweekbare bacteriën een iets sterkere stijging van de lysin-titer tot stand komen. Hoe lager de begintiter is, des te lager is de titer, waarbij de snelle vermindering van het aantal kweekbare bacteriën optreedt.

Indien de resultaten van deze proefnemingen vergeleken worden met die van Doerr en Grüninger, dan zijn de volgende verschillen te constateeren.

Doerr en Grüninger vinden een coïncidentie tusschen de titerstijging en de toeneming van het aantal kweekbare bacteriën. Heeft de titer haar maximum bereikt, dan wordt de afsterving grooter dan de vermeerdering. In de laatste phase, waarin steeds meer bacteriën afsterven, tot een volkomen sterilisatie toe, komt volgens Doerr en Grüninger nimmer een lysinverhooging tot stand. De lysis begint volgens hen, zoodra de titer een bepaalde waarde (titer 5) bereikt heeft.

In onze proefnemingen kan men geen coïncidentie waarnemen tusschen de titerstijging en de toeneming van het aantal kweekbare bacteriën. Ook tijdens de daling van het aantal kweekbare bacteriën blijft de titerstijging aanhouden. Zelfs nadat de lysis is opgetreden, wordt soms nog een sterke titerstijging geconstateerd. Volgens onze proefnemingen begint de lysis niet bij een bepaalde absolute waarde, maar bij verschillende titers; de lysis treedt op in Tabel II bij titer 4, in Tabellen III en IV bij titer 5 en in Tabel V bij titer 6.

In hoeverre deze belangrijke verschillen in uitkomsten voort-

vloeien uit het feit, dat DOERR en GRÜNINGER hun proefnemingen verrichtten met colibacillen en coli-lysin en deze onderzoekingen uitgevoerd werden met SHIGA-bacillen en SHIGA-lysin, wenschen wij in het midden te laten.

* * *

De uitkomsten der proefnemingen, zooals deze tot nu toe door ons en anderen (DOERR en GRÜNINGER, e.a.) werden verkregen, konden ons niet bevredigen. De oorzaak van deze niet-bevrediging is gelegen in de gebrekkige methodiek. De wijze van proefneming toch bestond hierin, dat vastgesteld werden de aantallen kweekbare bacteriën, in verschillende perioden van het lytisch proces aanwezig, benevens de graden van troebelheid, welke in die perioden optraden. Uit de toeneming van het aantal kweekbare bacteriën werd geconcludeerd tot een vermeerdering, uit de afneming van het aantal kweekbare bacteriën tot een afsterven van de aanwezige levende kiemen, terwijl een en ander nog nader werd gecontroleerd door de intensiteit van troebelheid, welke waargenomen kon worden. De graad van troebelheid bleek echter niet altijd een betrouwbare maatstaf te zijn voor de toeneming of vermindering van het aantal kweekbare bacteriën, daar onmiddellijk na de snelle daling van het aantal kweekbare bacteriën de troebelheid nog gedurende eenigen tijd niet alleen onveranderd bleef, maar zelfs nog intensiever kon worden (pag. 19). Bovendien — en dit is van nog veel grooter beteekenis — stelden de verrichte onderzoekingen ons niet in de gelegenheid te beoordeelen, in hoeverre er misschien gelijktijdig met de vermeerdering der bacteriën ook een afsterving tot stand kwam. En indien zulks het geval was, hoe groot was dan de intensiteit der vermeerdering en de intensiteit der afsterving in de verschillende stadia van het lytisch proces? Op al deze vragen kon de toegepaste methodiek geen antwoord geven. Niettemin is het volkomen duidelijk, dat een helder inzicht in het mechanisme van het lytisch proces alleen dàn te verkrijgen is, indien tijdens het proces, in samenhang met de toeneming van het bacteriophage lysin, het geheele

verloop van de bacteriënbevolking, wat vermeerdering en afsterving betreft en zulks zoowel qualitatief als quantitatief, op den voet gevolgd kan worden. Dit doel nu is geheel te bereiken door de toepassing van de *microscopische telmethode* van KLEIN, gecombineerd met de cultuurmethode. De microscopische telmethode van KLEIN toch leert het totale aantal voorhanden bacteriën kennen, doode èn levende samen; de cultuurmethode wijst alleen het aantal levende bacteriën aan. De toepassing der microscopische telmethode van KLEIN levert bovendien nog het belangrijke voordeel op, de veranderingen, welke de bacteriën in de verschillende phasen van het lytisch proces ondergaan, microscopisch nauwkeurig te kunnen bestudeeren; bij het maken der telpraeparaten blijven de oorspronkelijke vormen en grootten der bacteriën het best bewaard.

KLEIN wees er op, dat de bacteriën in vochtigen toestand de kleurstof gemakkelijker opnemen dan in drogen toestand, zooals bij de kleurmethode volgens KOCH geschiedt; door het voorafgaand drogen en fixeeren der praeparaten bij de kleuring volgens KOCH wordt de latere opneming der kleurstoffen nadeelig beïnvloed. Moeilijk kleurbare objecten (sporen van bacteriën, tuberkelbacillen, e.a.) zijn bij toepassing van de kleurmethode volgens KLEIN snel te tingeeren [sporenkleuringsmethode volgens KLEIN (31)].

Bij de vochtige kleuring der bacteriën is het afspoelen der praeparaten overbodig geworden en zoo kon KLEIN (32) — aldus beschrijft J. IDZERDA (33) — het door hem ingevoerd principe van de vochtige kleuring op de volgende wijze aan de nieuwe microscopische telmethode ten grondslag leggen: een bekende hoeveelheid vloeistof, waarin niet te weinig, vochtig gekleurde bacteriën in homogene emulsie aanwezig zijn, wordt gelijkmatig uitgestreken op een dekglas, gedroogd, gefixeerd en ingesloten; nagegaan wordt, hoeveel bacteriën zich in een zeker aantal gezichtsvelden bevinden, waaruit dan het totale aantal bacteriën berekend kan worden.

Bij de toepassing van de KOCH'sche kleurmethode moeten de praeparaten na de kleuring in water afgespoeld worden, hetgeen, ondanks de voorafgegane fixatie, tot een wisselend en dikwijls

zeer groot verlies van bacteriën in het microscopisch praeparaat aanleiding geeft. Vergelijkende waarnemingen (34) hebben geleerd, dat dit verlies gemiddeld 70 % bedraagt van het aantal bacteriën, in de KLEIN'sche preparaten geteld.

De verschillende, langs experimenteelen weg bestudeerde voorwaarden [KLEIN, (32, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 en 42), HEHEWERTH (34), IDZERDA (33)] voor de toepassing der microscopische telmethode volgens KLEIN, zijn de volgende:

1. Als minimum aantal moet één bacterie op de 2 tot 3 gezichtsvelden geteld kunnen worden, zal de telling een voldoenden graad van nauwkeurigheid bereiken; hetgeen derhalve beteekent, dat er in het geheele microscopische praeparaat, bv. op ronde dekglaasjes van 15 mM. middellijn, minstens eenige duizenden bacteriën aanwezig dienen te zijn. Bij onze microscopische tellingen bevatte een dergelijk dekglaasje bij de toegepaste vergrooting 8789 gezichtsvelden. Hieruit kan afgeleid worden, dat in bacteriënhoudende vloeistoffen, waarvan gewoonlijk 1—1.5 mgr. gebezigd wordt voor het maken der telpraeparaten op dekglaasjes van de aangegeven grootte, als minimum aantal eenige millioenen bacteriën per c.c. voorhanden moeten zijn, om een voldoend nauwkeurige microscopische telling mogelijk te maken. Is het aantal aanwezige bacteriën kleiner dan eenige millioenen per c.c., dan dient een concentratie van de bacteriën aan de uitvoering van de microscopische telmethode vooraf te gaan. Bij de aanwezigheid van zeer groote aantallen bacteriën, waardoor de tellingen der bacteriën per gezichtsveld bemoeilijkt zouden worden, wordt de bacteriënemulsie met een bekende hoeveelheid steriele, physiologische NaCl-solutie verdund.

2. De overbrenging van de kleurstof-bacteriënemulsie op het dekglaasje geschiedt met behulp van een gecalibreerde platinalus, indien althans het aantal bacteriën per c.c. vastgesteld dient te worden. Kan echter volstaan worden met het bepalen van de verhouding van het aantal microscopisch telbare tot het aantal kweekbare bacteriën, dan is het gebruik van een gecalibreerde lus overbodig; de telpraeparaten en de cultuurplaten worden alsdan met dezelfde lus gemaakt.

De in de lus aanwezige emulsie wordt zoo gelijkmatig mogelijk over de geheele oppervlakte van het volkomen vetvrije dekglaasje uitgestreken; ronde dekglaasjes zijn voor dit doel het meest geschikt. Het uitstrijken wordt voortgezet zoo lang er zich nog kleine vochtdruppeltjes op het praeparaat vertoonen. Is het praeparaat volkomen droog, dan mag niet langer gewreven worden; verstuiving van materiaal zou alsdan tot verlies van bacteriën aanleiding geven.

Het aantal bacteriën, dat aan de platina-lus blijft hangen, blijkt zeer gering te zijn; tegenover het totale aantal bacteriën, dat op het praeparaat wordt gebracht, kan deze kleine fout verwaarloosd worden.

De fixatie der praeparaten geschiedde aanvankelijk bij de invoering der telmethode door middel van de vlam; later voerde Klein (35) een modificatie in, waardoor het fixeeren in de vlam niet meer noodig was. Klein zag namelijk zijn telpreparaten somwijlen spoedig ontkleuren. Reeds een zeer geringe zure reactie van de bacteriënemulsie of van den gebruikten xylol-canadabalsem kon aanleiding geven tot het loslaten van de dunne samenhangende laag op het dekglaasje, waarop dan ontkleuring der bacteriën volgde. Ten einde dit loslaten te verhinderen, gebruikte Klein een gesmolten, volkomen heldere, 5 %-gelatine-oplossing in water, waarvan een platina-lus op het dekglas met de vochtig gekleurde bacteriën vermengd werd; de gelatine deed derhalve dienst als kleefstof. Na dien tijd vond geen ontkleuring van praeparaten meer plaats.

De praeparaten worden ingesloten in neutraal reageerenden xylol-canadabalsem.

Bij de telling, vooral indien er een groot aantal bacteriën per gezichtsveld aanwezig is, wordt met voordeel gebruik gemaakt van een net-oculair.

Voor de berekening van het aantal bacteriën, dat zich op het dekglaasje bevindt, is de telling van 50 gezichtsvelden voldoende; bij het tellen wordt het praeparaat zoodanig verschoven, dat de getelde gezichtsvelden zooveel mogelijk verspreid liggen over het dekglaasje. Regelmatig worden 2 praeparaten gemaakt en in ieder praeparaat 50 gezichtsvelden geteld.

3. Bij vergelijking van de microscopische telmethode van KLEIN met de cultuurmethode van KOCH en wel met culturen, waarvan alle bacteriën in levenden toestand verkeeren (b.v. zeer jonge bouillonculturen), blijken de aantallen bacteriën, gevonden met de methode van KLEIN, steeds grooter te zijn dan die, welke de cultuurmethode opleveren. De oorzaak van dit verschil is hierin gelegen, dat meerdere bacteriën, welke tot één verband vereenigd zijn of zich dicht bij elkander bevinden, op de cultuurplaat slechts één kolonie vormen, terwijl zij in de microscopische praeparaten afzonderlijk geteld worden. Het verschil in aantal tusschen de beide methoden wordt des te grooter, naarmate bij de bacteriënsoort de verbandvorming meer op den voorgrond treedt (staphylococcen, streptococcen). Ook in culturen van uitsluitend levende bacteriën geeft derhalve de microscopische telmethode nauwkeuriger uitkomsten dan de cultuurmethode; de met de microscopische telmethode gevonden aantallen komen dichter bij de aantallen werkelijk aanwezige levende bacteriën dan die, welke met de cultuurmethode worden aangetoond. Zijn er afgestorven bacteriën in de cultuur voorhanden, dan wordt het verschil tusschen de aantallen bacteriën, gevonden met de microscopische telmethode en de cultuurmethode, grooter, welk verschil stijgt met de toeneming van het aantal doode bacteriën in de cultuur.

De verhouding van het aantal kweekbare bacteriën tot het aantal microscopisch telbare bacteriën wordt het *verhoudingsgetal* genoemd, dat in percenten uitgedrukt wordt.

Het percentage, dat de afgestorven bacteriën in een bacteriënbevolking innemen ten opzichte van het totaal aantal voorhanden bacteriën, wordt bestempeld met den naam van *steriliteitspercentage*. Het steriliteitspercentage geeft dus den graad van steriliteit aan, welke een bacteriënbevolking bezit.

Bij onze proefnemingen werd de microscopische telmethode van KLEIN als volgt uitgevoerd. Van de bacteriënhoudende vloeistof werd 1 c.c. (of, bij aanwezigheid van een zeer groot aantal bacteriën, 1 c.c. van een 10-voudige verdunning van de bacteriënemulsie met steriele, physiologische NaCl-oplossing) vermengd met $^3/_4$ c.c. van een minstens 24 uren oude, versch gefiltreerde

anilinewater-gentianaviolet-oplossing. Dit mengsel werd gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur gehouden en daarna gedurende 5 minuten in een waterbad van 37° C. geplaatst. Vervolgens werd $^1/_4$ c.c. eener gesmolten, 5 % gelatineoplossing in water toegevoegd en het mengsel goed geschud. De oorspronkelijke hoeveelheid bacteriënemulsie was dus juist verdubbeld, hetgeen bij de berekening van het aantal bacteriën in aanmerking genomen werd. Uit de gelatine-houdende kleurstof-bakteriënemulsie werden nu met dezelfde platina-lus, waarmede de agarplaten gegoten waren, de telpraeparaten gemaakt.

* * *

Alvorens met de toepassing van de microscopische telmethode bij het lysisproces aan te vangen, was het, om vergelijking mogelijk te maken, noodzakelijk in bouillonculturen van den door ons gebezigden SHIGA-KRUSE-stam de verschillen in aantallen, tusschen de KLEIN'sche telmethode en de KOCH'sche plaatmethode constateerbaar, nauwkeurig vast te stellen.

Kolven met 25 of 100 c.c. sterielen bouillon werden geënt met $^1/_4$—2 c.c. eener 18-urige SHIGA-bouilloncultuur en bij 37° C geplaatst. Onmiddellijk na de enting en vervolgens op verschillende tijdstippen daarna, werden de beide telmethoden toegepast; berekend werd het percentage van het aantal kweekbare tot het aantal microscopisch telbare bacteriën (verhoudingsgetal).

In de Tabellen VI tot en met XI zijn de resultaten opgenomen.

Na een groei gedurende 4 uren bij 37° C., in welken tijd met zekerheid nog geen afsterving van bacteriën heeft plaats gevonden, zien wij verhoudingsgetallen optreden van 84 (Tabellen VI en VII), van 87 (Tabel VIII), van 88 (Tabel IX), enz. Gedurende de eerste 24 uren vinden wij in al deze tabellen deze zelfde verhoudingsgetallen terug; wij kunnen derhalve concludeeren, dat in bouillonculturen van onze SHIGA-bacillen, bij 37° C. gecultiveerd, gedurende de eerste 24 uren geen afsterving van bacteriën tot stand komt. Indien men nu van de proefnemingen, welke in de eerste 24 uren verricht zijn, van elke tabel het gemiddelde neemt,

TABEL VI.

25 c.c. bouillon + $^1/_{10}$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur.

Tijd (uren)	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Verhoudingsgetal.
0	344		
1	668		
2	1414		
3	5800	6983	81
$3^1/_2$	11400	12305	93
4	26400	31640	84
$4^1/_2$	38700	45602	85
5	67000	77343	87
24	164000	201716	82
48	188000	457028	41
72	54000	544918	10

TABEL VII.

25 c.c. bouillon + 1 c.c. SHIGA-bouilloncultuur.

Tijd (uren)	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Verhoudingsgetal.
0	1800		
1	3600	4570	79
4	62000	73828	84
5	142000	161718	78

TABEL VIII.

25 c.c. bouillon + 1 c.c. SHIGA-bouilloncultuur.

Tijd (uren)	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Verhoudingsgetal.
0	1700		
1	2600		
2	12100		
3	38000	42000	91
$3^1/_2$	76000	84574	90
4	119000	137916	87
24	340000	460312	74
48	256000	827734	31
72	130000	1250600	10
96	40000	1051164	4

TABEL IX.

25 c.c. bouillon + 1 c.c. SHIGA-bouilloncultuur.

Tijd (uren)	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Verhoudingsgetal.
0	2560		
1	3940	5623	71
2	11700	15820	74
3	49000		
$3^1/_2$	80000	91406	87
4	105000	119515	88
$4^1/_2$	122000	154616	79
5	135000	165233	81
24	326000	386716	85

TABEL X.

25 c.c. bouillon + 2 c.c. SHIGA-bouilloncultuur.

Tijd (uren)	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Verhoudingsgetal.
0	3720	5273	70
1	5620	7085	79
2	18000	22148	81
$3^1/_2$	86000	98437	87
24	304000	344529	90
72	144000	894526	16
96	92000	622261	15

TABEL XI.

100 c.c. bouillon + $^1/_4$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur.

Tijd (uren)	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Verhoudingsgetal.
0	149		
1	254		
2	640		
3	1460		
$3^1/_2$	3685	4043	91
4	6720	7734	87
$4^1/_2$	8000	9844	81
5	14700	18281	80
$5^1/_2$	34500	36562	93
20	80600	108984	74
23	103700	123046	84
26	172000	207420	86
70	215500	839839	26
90	54500	256639	21

dan vindt men in Tabel VI een gemiddelde van 85, in Tabel VII van 80, in Tabel VIII van 86, in Tabellen IX en X van 81 en in Tabel XI van 85. Het gemiddelde van alle 33 proefnemingen bedraagt 83, hetgeen derhalve beteekent, dat in bouillonculturen, uitsluitend bestaande uit levende SHIGA-bacillen, door middel van de cultuurmethode gemiddeld slechts 83 % van het werkelijk aantal aanwezige levende bacillen wordt gevonden.

Uit de verkregen gegevens werd tevens de generatieduur bepaald. Bij de bepaling van den generatieduur werden de cultureele aantallen uit de eerste groeiperiode genomen, teneinde zeker te zijn den juisten generatieduur te verkrijgen, aangezien in de latere perioden stoornissen in de vermeerdering (door ophooping van stofwisselingsproducten, enz.) optreden. De cultureele aantallen in het eerste uur werden niet medegerekend, om de periode van niet-vermeerdering, welke bij iedere overenting in den aanvang voorkomt, uit te schakelen. In de Tabellen VI, VII, VIII, IX en XI werd de generatieduur berekend uit de aantallen kweekbare bacteriën, welke na 1 uur en na 4 uren gevonden werden; zij bedragen resp. 34 minuten, 43 minuten, 36 minuten, 40 minuten en 38 minuten; in Tabel X werd de generatieduur bepaald van 1 uur tot $3^1/_2$ uren, in welke periode hij 38 minuten blijkt te bedragen. De gemiddelde generatieduur van al deze bepalingen levert dus een waarde op van 38 minuten.

* * *

Lytische processen met lagere begintiters (tot en met titer 4). Kolven met 100 c.c. bouillon werden weder tevoren in den thermostaat bij 37° C. geplaatst, opdat de bouillon bij het begin van de proefnemingen dezen temperatuurgraad zou hebben verkregen. Aan deze kolven werden alsdan verschillende hoeveelheden lysin toegevoegd, zoodanig, dat de begintiters in de verschillende kolven uiteenloopende waarden bereikten (0—1, 1, 2, 3, 4). Daarna werden verschillende hoeveelheden ($^1/_4$ c.c. of 5 c.c.) van een 18-urige SHIGA-bouilloncultuur in de kolven gebracht. Vervolgens werden onmiddellijk na de toevoeging van lysin en SHIGA-bacillen 3 c.c. vloeistof uit de kolf genomen. Hiervan werd 1 c.c. gebruikt

voor de titerbepaling, 1 c.c. voor het maken van 2 microscopische telpraeparaten en 1 c.c., 10- of 100-voudig verdund, voor het bereiden van 2 agarplaten, waarvoor in de latere perioden van het lysisproces niet alleen een lus, maar ook $^1/_{10}$ c.c. materiaal genomen werd. Nadat de kolven 60, 90, 120 minuten, enz. bij 37° C. gestaan hadden, werden geheel op dezelfde wijze de aantallen kweekbare en microscopisch telbare bacteriën, benevens de lysintiter bepaald.

Van sommige kolven werd meer speciaal het begin van het proces onderzocht en na 30, 45, 60, 90 en 120 minuten het gehalte aan kweekbare, microscopisch telbare bacteriën en lysin nagegaan (Tabellen XV, XVI en XVII); teneinde bij deze proefnemingen ook kleinere verschillen in de titer te kunnen vaststellen, werden 2 reeksen van verdunningen volgens APPELMANS gemaakt, de eene op de gewone wijze en de andere door 1 c.c. vloeistof te voegen bij 4 c.c. bouillon en vervolgens weder op de gewone wijze 10-voudige verdunningen te maken.

TABEL XII.

100 c.c. bouillon + $^1/_4$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 2—3).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën per lus.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.		Afsterving.			Generatieduur (minuten).	Troebelheid.	Lysintiter.
			totaal	abnorm.	Aantal afgestorven bacteriën.	Steriliteitspercentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.			
0	218								0	0 — 1
45	190								0	
105	304								0	
135	920								+	
180	1860								++	
210	2708	3262	4395		1133	26			++	
240	5040	6072	6855		783	11			++	
300	6440	7760	7559						++	
330	6700	8072	18457		10385	56	}56	}23	+++	
390	215	247	39375		39128	99	}99		++++	
450	22	25	7031	zeer veel	7006	99			++++	
30 u.	40000		44648						+++++	

TABEL XIII.

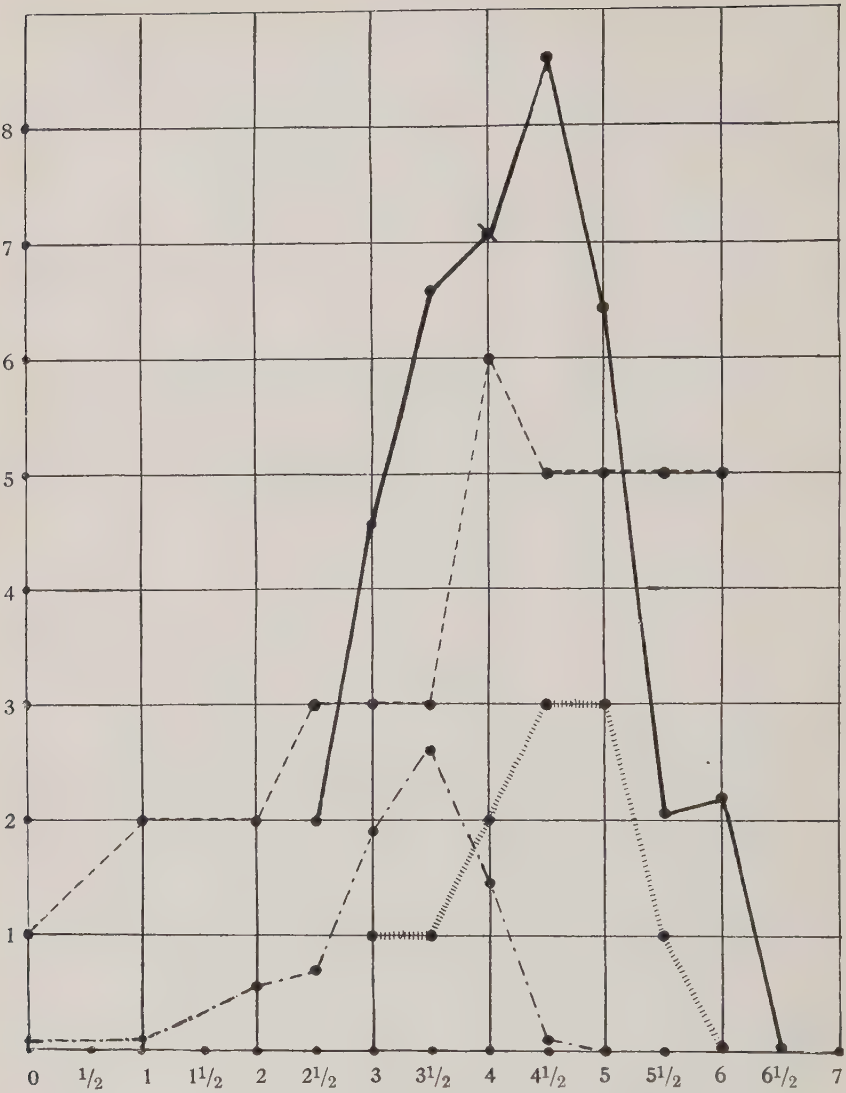
100 c.c. bouillon + 1/4 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 3).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën. per lus.	Aantal kweekbare bacteriën. per 1/10 c.c.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën. totaal	Aantal microsc. telbare bacteriën. abnorm.	Afsterving. Aantal afgestorven bacteriën.	Afsterving. Steriliteits-percentage.	Afsterving. Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.	Generatieduur (minuten).	Troebelheid.	Lysin-titer.
0	146									0	1
60	210									0	2
120	520									0	2
150	715		861	1934		1073	55			0	3
180	1960		2227	4570		2343	51	}36	} 22	+	3
210	2640		3180	6680		3500	52	}27		+	3
240	1455		1754	7031		5277	75	}50		++	4
270	40	8	48	8613	6328	8565	99	}98		+++	6
300	0	6		5801	5801	5801	100			+++	5
330	0	12		2109	2109	2109	100			+	5
360	0	32		2461	2461	2461				0	
390	0	38								0	5
24 u.		2								0	7

TABEL XIV.

100 c.c. bouillon + 1/4 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 3).

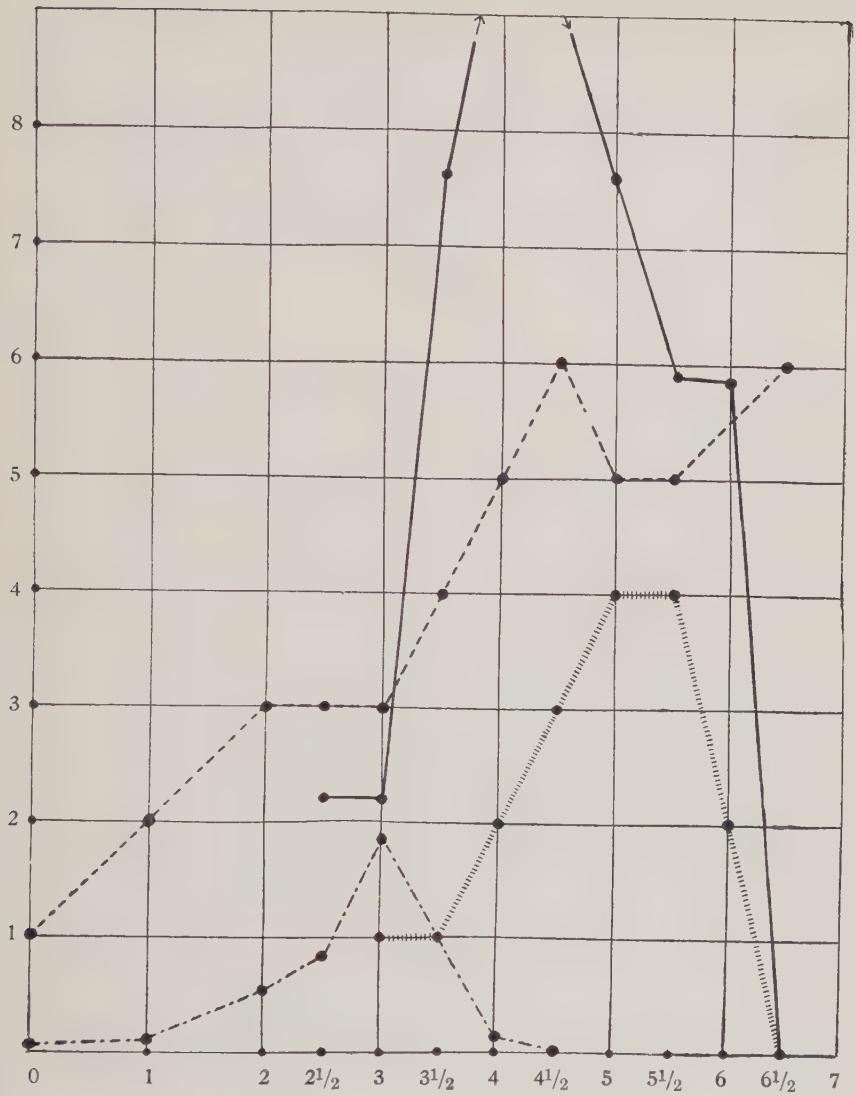
Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën. per lus	Aantal kweekbare bacteriën. per 1/10 c.c.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën. totaal	Aantal microsc. telbare bacteriën. abnorm.	Afsterving. Aantal afgestorven bacteri n.	Afsterving. Steriliteits-percentage.	Afsterving. Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.	Generatieduur (minuten).	Troebelheid.	Lysin-titer.
0	118									0	1
60	200									0	2
120	590									0	3
150	710									0	3
180	1900		2290	2461		161		} 85	}17	+	3
210	1000		1204	7734		6534	84			++	4
240	70							} 100	} 26	++	5
270	0	8		11601		11601	100			+++	6
300	1	42		7734	7734	7733				++++	5
330	0	45		5977	5977	5977				++++	5
360		45		5977	5977	5977				++	
390		120								0	6
24 u.										0	



Graphische voorstelling van Tabel XIII.

- - - - - - - lysin-titer.
— · — · — · kweekb. bacteriën.
———— microsc. telb. bacteriën.
ıııııııııııııı troebelheid.

De cijfers op de horizontale lijn beteekenen uren, de cijfers op de verticale lijn duizendtallen bacteriën, lysin-eenheden en intensiteit van troebelheid.



Graphische voorstelling van Tabel XIV.

- - - - - - - lysin-titer.
—·-·-·— kweekb. bacteriën.
———— microsc. telb. bacteriën.
ıııııııııı troebelheid.

De cijfers op de horizontale lijn beteekenen uren, de cijfers op de verticale lijn duizendtallen bacteriën, lysin-eenheden en intensiteit van troebelheid.

TABEL XV.

100 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 4).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Afsterving.			Troebelheid.	Lysintiter.
				Aantal afgestorven bacteriën.	Sterililteitspercentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.		
0	4670						+	2
15	4800						+	2
30	4800	5788	5801			} 22	+	$1^1/_2$
45	5600	6747	7383	636	9		+	$1^1/_2$
60	7210						++	2

TABEL XVI.

100 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 4—5).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Afsterving.			Troebelheid.	Lysintiter.
				Aantal afgestorven bacteriën.	Sterililteitspercentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.		
0							+	$2^1/_2$
15	3000	3614	4746	132		}	+	$2^1/_2$
30						48	+	$2^1/_2$
45	3800						+	0
60	4050	4880	8789	3909	44		+	1
75	4600						+	$1^1/_2$
90	5400	6506	9668	3163	33		++	$1^1/_2$
105	8000						++	2

TABEL XVII.

100 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 5).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc telbare bacteriën.	Afsterving. Aantal afgestorven bacteriën.	Sterliliteits-percentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.	Troebelheid.	Lysin-titer.
0	3640						+	3
15	3650						+	
30							+	$2^1/_2$
45							+	
60	6600	8000	14062	6062	43	8	++	$3^1/_2$
75							++	
90	8000	9636	16523	6887	42		++	$3^1/_2$
105							++	
120	10600	12770	19633	6863	35		++	4
300							+++	6
330							0	

TABEL XVIII.

100 c.c. bouillon + $^1/_4$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 6).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën. per lus	Aantal kweekbare bacteriën. per $^1/_{10}$ c.c.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën. totaal	Aantal microsc. telbare bacteriën. abnorm.	Afsterving. Aantal afgestorven bacteriën.	Sterliliteits-percentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.	Generatieduur (minuten).	Troebelheid.	Lysin-titer.
0	278									0	4
60	530									0	
150	1310									+	
180	3780		4554	4746		192		82	33	++	
210	1290		1554	8789		7235	82			+++	
240	20		24	5976	zeer veel	5952	99			++++	
270	1			2285		2284	99			++	
300	0			703						+	
330	0	40								0	
360	1	50								0	
390	1	60								0	
24 u.	0									0	10

Kweekbare bacteriën. De toeneming van het aantal kweekbare bacteriën wordt na 45 tot 60 minuten merkbaar, zooals in de Tabellen XV, XVI en XVII aangegeven staat. Deze toeneming geschiedt in den aanvang regelmatig, zooals ook reeds in de vorige proefnemingen werd gevonden. Eveneens valt hier op te merken, dat bij een lagere begintiter de duur van de toeneming van het aantal kweekbare bacteriën langer is dan bij een hoogere begintiter. In Tabel XII, bij een begintiter kleiner dan 1, houdt de toeneming van het aantal kweekbare bacteriën aan tot 330 minuten en in Tabel XVIII, met een begintiter 4, tot 180 minuten.

Het maximum aantal kweekbare bacteriën, dat bereikt wordt, is bij een hoogere begintiter ook hier — bv. in Tabel XVIII met begintiter 4 — relatief belangrijk kleiner dan bij een lagere begintiter (zie o.a. Tabel XII met een begintiter, welke iets kleiner is dan 1).

De daling van het aantal kweekbare bacteriën geschiedt ook hier zeer snel. In Tabel XII geschiedt de daling in 60 minuten van 6700 tot 215; in Tabel XIII van 2640 tot 40, in Tabel XIV van 1900 tot 70 en in Tabel XVIII van 3780 tot 20, eveneens alle in 60 minuten.

Na de daling van het aantal kweekbare bacteriën is vooral bij lagere begintiter (tabel XII) zeer spoedig een secundaire cultuur waarneembaar. Doch ook bij hoogere begintiter ziet men op de snelle daling veelal weder een geringe toeneming voor den dag treden; na 24 uren is echter deze toeneming weder verminderd of geheel verdwenen (Tabellen XIII en XVIII).

Levende bacteriën. De vergelijkende proefnemingen tusschen de KLEIN'sche en de KOCH'sche telmethode hebben geleerd, dat het aantal kweekbare bacteriën gemiddeld 83 % bedraagt van het werkelijk aantal aanwezige levende bacteriën; deze aantallen levende bacteriën zijn in de tabellen aangegeven.

Microscopisch telbare bacteriën. Het aantal microscopisch telbare bacteriën neemt in de eerste periode (toeneming van het aantal levende bacteriën) regelmatig toe. Maar ook, nadat het maximum aantal levende bacteriën bereikt is, blijft het aantal microscopisch telbare bacteriën nog toenemen. In Tabel XII is

het maximum aantal levende bacteriën bereikt na 330 minuten, terwijl het aantal microscopisch telbare bacteriën vanaf 330 tot 390 minuten nog stijgt van 18457 tot 39375. In Tabellen XIII en XIV is na 210, resp. 180 minuten, het maximum aantal levende bacteriën bereikt en na 270 minuten treedt eerst het maximum aantal microscopisch telbare bacteriën op. In Tabel XVIII wordt na 180 minuten het maximum aantal levende bacteriën geconstateerd, terwijl het maximale aantal miscroscopisch telbare bacteriën na 210 minuten gevonden wordt. Hieruit volgt, dat gedurende 30 tot 90 minuten nà het bereiken van het maximum aantal levende bacteriën nog een vermeerdering van de levende bacteriën tot stand komt; bij de toepassing alleen van de cultuurmethode is deze vermeerdering niet te vinden.

Eerst 30 tot 90 minuten na den aanvang van de snelle daling van het aantal levende bacteriën begint derhalve ook het aantal microscopisch telbare bacteriën een vermindering en wel een vermindering in zeer korten tijd te vertoonen. In Tabel XII daalt het aantal microscopisch telbare bacteriën in 60 minuten van 39375 tot 7031; eveneens in 60 minuten in Tabel XIII van 8613 tot 2109 en in Tabel XIV van 11601 tot 5977 en in Tabel XVIII in 90 minuten van 8789 tot 703. Meestal 90 tot 120 minuten na het begin van de daling zijn er microscopisch geen of zeer weinig bacteriën meer waar te nemen (behalve in de proefnemingen, waar zeer snel een secundaire cultuur optreedt — Tabel XII).

In de latere stadia van het lysisproces vertoonen de bacteriën in toenemend aantal een abnorm aspect (zie pag. 57); de aantallen dezer abnorme bacteriën zijn bepaald en in de tabellen opgenomen.

Afsterving der bacteriën. De aantallen afgestorven bacteriën zijn berekend door het aantal levende bacteriën af te trekken van het totale aantal microscopisch telbare bacteriën; zij zijn in de tabellen aangegeven.

Het blijkt, dat in de eerste periode tijdens de toeneming van het aantal levende bacteriën reeds een aantal afgestorven bacteriën aanwezig is.

Deze aantallen afgestorven bacteriën nemen in het verloop van het proces sterk toe, om 30 tot 90 minuten, nadat het maximale aantal levende bacteriën gevonden wordt, het hoogste punt te bereiken. In Tabel XII zijn na 210 minuten 1133 bacteriën afgestorven, na 330 minuten 10385 en na 390 minuten 39128. In Tabel XIII neemt het aantal afgestorven bacteriën van 150 tot 300 minuten regelmatig toe van 1073 tot 8565. In Tabel XIV neemt het aantal afgestorven bacteriën toe van 161 tot 11601 in 90 minuten en in Tabel XVIII van 192 tot 7235 in 30 minuten.

Nadat het aantal afgestorven bacteriën zijn maximum bereikt heeft, daalt dit aantal zeer snel; in 60 minuten in Tabel XII van 39121 tot 7006, in Tabel XIII van 8565 tot 2109 en in Tabel XVIII van 7235 tot 2284.

De intensiteit van afsterving der bacteriën op de verschillende tijdstippen van het lytisch proces wordt aangegeven door de berekende steriliteitspercentages. In Tabel XIII strekt de eerste periode zich uit tot en met 210 minuten; na 150 minuten is het steriliteitspercentage echter reeds 55, na 180 minuten 51 en na 210 minuten 52. In Tabel XV wordt na 45 minuten reeds een steriliteitspercentage van 9 gevonden, in Tabel XVI na 60 minuten een steriliteitspercentage van 44 en in Tabel XVII na 90 minuten van 42, terwijl in deze 3 proefnemingen het lysisproces zich nog in de periode van toeneming van het aantal levende bacteriën bevindt. Tijdens en vooral na het tijdstip, waarop het maximum aantal levende bacteriën bereikt wordt, is het steriliteitspercentage zeer groot. In Tabel XII is het steriliteitspercentage tijdens de aanwezigheid van het maximale aantal levende bacteriën 56 en 60 minuten daarna 99; in Tabel XIII zijn deze getallen resp. 52 en 99. De intensiteit van afsterving op de verschillende tijdstippen van het proces wordt derhalve voortdurend grooter. De opvatting van Doerr en Grüninger, dat alleen op een bepaald tijdstip van het proces plotseling een sterke afsterving plaats vindt, een opvatting, waartoe zij gekomen zijn op grond van de bepaling van de aantallen kweekbare bacteriën, is derhalve niet juist.

Teneinde de intensiteit van afsterving in de verschillende perioden van het lytisch proces vast te stellen, werden de *sterftecijfers*

van de bacteriënbevolking in die perioden berekend. Men neemt het aantal levende bacteriën, op een bepaald oogenblik van het proces aanwezig, bv. in Tabel XIII 861 na 150 minuten. Deze 861 levende bacteriën leveren in de periode van 150 tot 180 minuten 2343 — 1073 = 1270 bacteriën, die in deze periode afsterven. Bovendien stijgt het aantal levende bacteriën nog tot 2227; dus in deze periode worden de 861 levende bacteriën tot 2227 + 1270 = 3497 bacteriën. Van deze 3497 aanvankelijk levende bacteriën zijn in die periode 1270 afgestorven, d.w.z. 36 % van het totale aantal levende bacteriën. Wij noemen nu 36 het sterftecijfer van de bacteriënbevolking in de periode van 150 tot 180 minuten, hetgeen derhalve zeggen wil, dat in die periode 36 bacteriën zijn afgestorven van elke 100 bacteriën, welke in die periode in levenden toestand aanwezig zijn geweest.

De berekende sterftecijfers, welke in de tabellen zijn aangegeven, stellen minima voor, omdat in die perioden ook afgestorven bacteriën in oplossing kunnen zijn overgegaan, welke derhalve bij de microscopische telling niet meer gevonden worden; vooral is zulks natuurlijk mogelijk, indien in de telpraeparaten reeds talrijke abnorme vormen aangetroffen worden (bv. Tabel XIII, 270 minuten).

In Tabel XII is van 300 tot 330 minuten reeds een sterftecijfer 56 te constateeren; van 330 minuten, het moment, waarop het maximum aantal levende bacteriën bereikt wordt, tot 390 minuten, is het sterftecijfer zelfs gestegen tot 99. In Tabel XIII is een toeneming van de intensiteit der afsterving in de verschillende perioden eveneens waar te nemen: van 150 tot 180 minuten bedraagt het sterftecijfer 36, van 210 tot 240 minuten 50 en van 240 tot 270 minuten 98. Uit de sterftecijfers bij de verschillende proefnemingen gevonden, blijkt wel, dat de intensiteit van afsterving in het verloop van het proces aanzienlijk toeneemt. Ook reeds in de eerste periode, vóór het bereiken van het maximale aantal levende bacteriën, is dus een intensieve afsterving te constateeren, een afsterving, welke Doerr en Grüninger niet hebben waargenomen en met hun wijze van proefneming ook niet konden waarnemen. Vooral onmiddellijk na de daling van het aantal levende bacteriën

wordt de afsterving buitengewoon intensief, hetgeen zeer duidelijk blijkt uit de sterftecijfers 99 (Tabel XII) en 98 (Tabel XIII).

Vermeerdering der bacteriën (generatieduur). Aangezien de vermeerdering der bacteriën reeds zeer spoedig gepaard gaat met afsterving, is het niet mogelijk, om alleen uit de aantallen levende bacteriën den generatieduur te bepalen. Daarom werd voor de berekening van den generatieduur gebruik gemaakt van het voordeel, dat de microscopische telmethode oplevert, waardoor het totaal aantal bacteriën (zoowel levende als afgestorven bacteriën) bekend is. Een voorbeeld ter toelichting. In Tabel XIII zijn na 150 minuten 861 levende bacteriën aanwezig. Deze 861 levende bacteriën leveren na 60 minuten 6680—1934 = 4746 bacteriën er bij. Indien er derhalve geen afsterving had plaats gevonden, zou het aantal levende bacteriën na 210 minuten niet 3180, maar 4746 + 861 = 5607 bedragen hebben. Het beginaantal wordt derhalve op 861 en het eindaantal op 5607 gesteld. Daar de tijd 60 minuten (210—150) bedraagt, wordt dus hieruit volgens de formule van Buchner-Riedlin een generatieduur berekend van 22 minuten. De werkelijke generatieduur is ongetwijfeld nog kleiner, daar gedurende de aangegeven periode een aantal bacteriën zijn afgestorven, welke dus geen nieuwe individuen leveren; bovendien volgt op de afsterving een oplossing der bacteriën, waardoor het aantal microscopisch telbare bacteriën te klein wordt gevonden. De door ons berekende generatieduren stellen derhalve maxima voor.

Indien wij nu in de verschillende proefnemingen de generatieduren nagaan, dan blijkt, dat deze belangrijk kleiner zijn dan in de Shiga-bouilloncultuur zonder toevoeging van het bacteriophage lysin; daar toch vonden wij bij 37° C. een gemiddelden generatieduur van 38 minuten. In Tabel XII bedraagt de generatieduur onmiddellijk vóór het bereiken van het maximale aantal levende bacteriën slechts 23 minuten; in Tabel XIII in dezelfde periode 22 minuten; in Tabel XIV tijdens de snelle daling van het aantal levende bacteriën 17 minuten en in Tabel XVIII, met een hoogere begintiter, in de periode van snelle daling van het aantal levende bacteriën, 33 minuten. Volkomen vast

staat derhalve, dat de generatieduur belangrijk verkort is en de vermeerdering der SHIGA-bacillen veel intensiever plaats vindt dan in de gewone SHIGA-bouilloncultuur en wel juist in die periode, waarin het aantal levende bacteriën veelal nog slechts in geringe mate toeneemt of zelfs reeds dalende is. Waar DOERR en GRÜNINGER bij hun proefnemingen uitsluitend het aantal kweekbare bacteriën bepaalden, bleef deze bijzonder intensieve toeneming van de vermeerdering der bacteriën geheel voor hen verborgen.

Troebelheid. Deze vertoont hetzelfde beeld als in de vorige reeks van proefnemingen. Tijdens de toeneming van het aantal levende bacteriën neemt de troebelheid regelmatig toe. Maar ook nà het bereiken van het maximale aantal levende bacteriën blijft de troebelheid nog toenemen. In Tabel XII bestaat na 390 minuten een meer intensieve troebelheid dan na 330 minuten, het moment, waarop het maximale aantal levende bacteriën gevonden wordt. In Tabel XIII is 30 minuten, nadat het aantal levende bacteriën maximaal geworden is, de troebelheid veel intensiever geworden. In Tabel XIV wordt 90 tot 120 minuten na het begin van de daling van het aantal levende bacteriën de maximale troebelheid gevonden en ook in Tabel XVIII is de troebelheid maximaal 60 minuten, nadat het aantal levende bacteriën het grootst is. Zooals reeds bij de vorige reeks van proefnemingen over het lytisch proces opgemerkt werd, kan de intensiteit van troebelheid in de phase van snelle daling van het aantal levende bacteriën niet verklaard worden uit het aantal levende bacteriën, Doch ook het aantal microscopisch telbare bacteriën kan niet geheel en al de intensiteit van troebelheid toelichten. In Tabel XII toch is na 390 minuten het aantal microscopisch telbare bacteriën maximaal, nl. 39375, terwijl dit aantal na 450 minuten nog slechts 7031 bedraagt en de troebelheid minstens even intensief is na 450 minuten als na 390 minuten. In Tabel XIII valt hetzelfde op te merken. In Tabel XIV is dit verschijnsel eveneens zeer duidelijk waar te nemen, want na 270 minuten zijn er 11601 microscopisch telbare bacteriën en na 300 minuten nog slechts 7734 voorhanden, terwijl toch na 300 minuten de troebelheid intensiever is dan na 270 minuten. In Tabel XVIII is na 240

minuten, toen er 5976 microscopisch telbare bacteriën aanwezig waren, de troebelheid intensiever dan na 210 minuten, toen er 8789 bacteriën microscopisch geteld werden. De verklaring voor deze merkwaardige verhouding van de troebelheid wordt gevonden in het microscopisch uiterlijk der bacteriën. Juist in die phase toch, waarin de maximale troebelheid optreedt, wordt het grootste aantal opgezwollen en korrelig-uitziende vormen aangetroffen. In Tabel XII bv. worden na 450 minuten de meeste opgezwollen en korrelige vormen gevonden; in Tabel XIV wordt na 300 en 330 minuten het grootste aantal abnorme vormen geconstateerd; in Tabel XVIII worden na 240 minuten de meeste abnorme vormen opgemerkt. De troebelheid van de culturen wordt derhalve mede veroorzaakt door de sterk opgezwollen bacteriënvormen; deze zijn oorzaak, dat ook nà de vermindering van het aantal microscopisch telbare bacteriën toch de troebelheid aanvankelijk nog dezelfde blijft, resp. nog toeneemt. De intensiteit van de troebelheid is derhalve in deze phasen van het lytisch proces geen juiste maatstaf, noch voor het aantal aanwezige levende bacteriën, noch voor het totale aantal voorhanden (levende èn doode) bacteriën.

Het helder worden van de bouilloncultuur, de lysis, wordt ongeveer 90—120 minuten na de maximale afsterving waargenomen; de afsterving is primair, de lysis secundair.

Lysin-titer. In den aanvang van het lytisch proces komt veelal een daling van de lysin-titer tot stand. In de proefnemingen XV, XVI en XVII, welke speciaal het onderzoeken van den toestand in het begin van het proces ten doel hadden, wordt dit duidelijk gedemonstreerd; in Tabel XV komt een daling van de lysin-titer van 2 tot $1^1/_2$ tot stand, in Tabel XVI van $2^1/_2$ tot 0 en in Tabel XVII van 3 tot $2^1/_2$. Deze aanvankelijke daling van de lysin-titer is reeds door verschillende onderzoekers waargenomen. D'Herelle schreef deze daling toe aan een binnendringen van den bacteriophaag in de bacterie. Doerr en zijn medewerkers verklaarden haar door een adsorptie van lysin aan de bacteriën.

Na de geringe daling van de lysin-titer is reeds spoedig een stijging van de titer waar te nemen, niet alleen gedurende de

toeneming van het aantal levende bacteriën, maar ook nog daarna. De stijging beantwoordt echter evenmin aan de toeneming van het aantal microscopisch telbare bacteriën, want ook tijdens het verminderen van dit microscopisch aantal bacteriën blijft de lysin-titer in de hoogte gaan. In Tabel XIII bv. wordt het maximale aantal levende bacteriën na 210 minuten gevonden, het maximale aantal microscopisch telbare bacteriën na 270 minuten, terwijl de titer daarna nog stijgt. Ook nadat geen vermeerdering van bacteriën meer plaats vindt, blijft derhalve de lysin-titer nog toenemen.

* * *

Lytische processen met hoogere begintiters. In deze reeks werden op dezelfde wijze, als in de vorige reeks beschreven is, de proefnemingen verricht, alleen met dit verschil, dat de begintiter hooger werd genomen. Zoo werden bij kolven met 100 c.c. bouillon 5 c.c. 18-urige SHIGA-bouilloncultuur en 1 c.c. onverdund lysaat met een titer 10 tot 11 of een verdund lysaat met titer 8 gevoegd.

Tabel XXI geeft een overzicht van het verloop van de troebelheid der culturen, de maxima der aantallen kweekbare en de maxima der aantallen microscopisch telbare bacteriën bij uiteen-

TABEL XIX.

100 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 8).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.		Afsterving.			Generatieduur (minuten).	Troebelheid.	Lysin-titer.
			totaal	abnorm.	Aantal afgestorven bacteriën.	Steriliteits-percentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.			
0	1990	2400	4922		2522	53	} 20		+	6
60	3100	3735	7207	3664	3472	48	} 34	} 30	++	
90	3600	4337	10019	4746	5682	57	} 97		++	
120	40	48	7031	6855	6983	99			+++	8
150	50	60	6328	6328	6268	99			+++	
180	0	0							0	10

TABEL XX.

100 cc. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 10—11).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.		Afsterving.		Troebelheid.	Lysintiter.
			totaal	abnorm.	Aantal afgestorven bacteriën.	Steriliteitspercentage.		
0	840	1012	12832		11820	92	+	8—9
30	20	24	7383	7383	7359	99	+	
60	20	24	5173	5173	5149	99	+?	
90	0	0	6328	6328	6328	100	0	7
120	0	0	—	—	—	—	0	

loopende begintiters (Tabellen XII, XIII, XVII, XVIII, XIX, XX).

Kweekbare bacteriën. De toeneming van het aantal kweekbare bacteriën duurt bij hoogere begintiter veel korter dan bij lagere begintiter, zooals zulks ook reeds in de vorige reeks van proefnemingen gebleken is; van de laagste tot de hoogste begintiter opstijgend, wordt derhalve de duur van de toeneming van het aantal kweekbare bacteriën korter tot er zelfs bij de hoogste begintiters (8—9) geen toeneming van het aantal kweekbare bacteriën meer optreedt (Tabel XX). (In zooverre is derhalve de meening van J. DE NECKER juist, dat het lysin de vermeerdering der sensibele bacteriën remt, indien althans bacteriophaag lysin met de hoogste titers toegevoegd wordt). In Tabel XIX met een begintiter 6 duurt de toeneming van het aantal kweekbare bacteriën slechts 90 minuten. (In Tabel XVIII met een begintiter 4 zagen wij o.a. de toeneming 180 minuten aanhouden).

Het maximum aantal kweekbare bacteriën, dat bereikt wordt, is bij de hoogste begintiters relatief veel geringer dan bij de lagere begintiters; in Tabel XIX met een begintiter 6 wordt bij een beginaantal van 2000 bacteriën een maximum van 3600 kweekbare bacteriën bereikt. (In Tabel XVIII o.a., met een begintiter 4, werd een stijging van een beginaantal 278 tot het maximum aantal 3780 waargenomen).

TABEL XXI.

Tijd (minuten).	Maxima.	Troebelheid.	Lysin-titer.	Maxima.	Troebelheid.	Lysin-titer.	Maxima.	Troebelheid.	Lysin-titer.	Maxima.	Troebelheid.	Lysin-titer.	Maxima.	Troebelheid.	Lysin-titer.	Maxima.	Troebelheid.	Lysin-titer.	Maxima.	Troebelheid.	Lysin-titer.	Maxima.	Troebelheid.	Lysin-titer.
0		0	0–1		0	1		+	3		0	4		0	5		+	6,7	⊙ ×	+	8,9	⊙ ×	+	9,10
30																				+			+?	
60						2		++	3½								++			+?			0	
90																⊙ ×	++			0				
120		+						++	4					+			+++							
150						3					+			++			+++							
180		++			+					⊙	++			+++			0							
210				⊙						×	+++													
240					++	4								0										
270				×	+++	6																		
300								+++	6		0													
330	⊙	+++			0			0																
360																								
390	×	+++																						

0: lysis
⊙: maximaal aantal kweekbare bacteriën.
×: maximaal aantal microscopisch telbare bacteriën.

De daling van het aantal kweekbare bacteriën geschiedt hier eveneens zeer snel. In Tabel XIX komt er in 30 minuten een daling van 3600 tot 40; in Tabel XX is het aantal kweekbare bacteriën, dat geschat kan worden op 83 % van het aantal microscopisch telbare bacteriën (12832), derhalve op 10651, onmiddellijk na de toevoeging van het bacteriophage lysin gedaald tot 840 en na 30 minuten tot 20. De daling van het aantal kweekbare bacteriën geschiedt bij de hoogere initiaaltiters veel sneller dan bij de lagere; in Tabel XIX met een begintiter 6 toch, is er in 30 minuten een daling van 3600 tot 40 en in Tabel XX met begintiter 8—9 momentaan een daling van 10651 tot 840. (Daarentegen vond er in Tabel XVIII, met een begintiter 4, in 30 minuten een daling plaats van 3780 tot 1290 en in Tabel XV, met begintiter 1, in 30 minuten een daling van 1900 tot 1000).

Microscopisch telbare bacteriën. Het aantal microscopisch telbare bacteriën neemt in de eerste periode van het lytisch proces intensief toe, veel intensiever dan het aantal levende bacteriën (Tabel XIX); bij de hoogste begintiter (Tabel XX, begintiter 8—9) treedt daarentegen, evenals zulks met de levende bacteriën het geval is, onmiddellijk een snelle daling op van het aantal microscopisch telbare bacteriën. Het tijdstip, waarop het maximum aantal microscopisch telbare bacteriën bereikt wordt, valt samen met het tijdstip, waarop het maximum aantal levende bacteriën gevonden wordt. Bij vergelijking met de proefnemingen met lagere begintiters blijkt derhalve, dat de tijdstippen, waarop de maxima van het aantal levende en microscopisch telbare bacteriën worden bereikt, elkander naderen, naarmate de begintiter hooger wordt. In Tabel XXI ziet men bij begintiter 0—1 en 1 de beide maximale grootheden 60 minuten na elkander optreden; bij begintiter 4 is er nog slechts een tusschenpooze van 30 minuten en bij begintiter 6 en hooger komt het maximum aantal microscopisch telbare bacteriën op hetzelfde moment als het maximum aantal levende bacteriën. De afneming van het aantal microscopisch telbare bacteriën geschiedt bij de hoogere begintiters in ongeveer denzelfden tijd (60—90 minuten) als bij de lagere begintiters.

Afsterving der bacteriën. Reeds onmiddellijk na de toevoeging

van het bacteriophage lysin zien wij bij deze hooge begintiters een groot aantal afgestorven bacteriën. In Tabel XIX zijn er 2522 bacteriën afgestorven op een totaal aantal van 4922 microscopisch telbare bacteriën en in Tabel XX, met een begintiter 8—9, zijn 11820 van de 12832 microscopisch telbare bacteriën afgestorven. Gedurende het verloop van de eerste periode en in het begin van de tweede periode neemt het aantal afgestorven bacteriën nog toe, indien te gelijker tijd althans nog een vermeerdering van levende bacillen optreedt. In Tabel XIX stijgt na 90 minuten het aantal afgestorven bacteriën van 2522 tot 5682 en na 120 minuten tot 6983. In Tabel XX, waar geen vermeerdering van bacteriën meer optreedt, wordt het aantal afgestorven bacteriën niet grooter, maar integendeel geringer, doordat bacteriën opgelost worden.

Het steriliteitspercentage heeft reeds van den aanvang af een hooge waarde en wordt in het verloop van het proces steeds grooter. Het steriliteitspercentage stijgt bij hoogere begintiter vroeger en intensiever dan bij lagere begintiter. In Tabel XIX is dit steriliteitspercentage onmiddellijk na de lysin-toevoeging 53; daarna stijgt het na 90 minuten tot 57 en na 120 minuten is het reeds 99; in Tabel XX is dit percentage onmiddellijk na de lysin-toevoeging reeds 92.

Hier is nog duidelijker waarneembaar dan bij lagere begintiters, dat in de periode vóór het bereiken van het maximum aantal levende bacteriën de intensiteit van afsterving reeds een zeer hoogen graad bereikt heeft. In Tabel XIX is gedurende de eerste 60 minuten een sterftecijfer van 20 berekend, in de periode van 60—90 minuten een sterftecijfer van 34 en in die van 90 tot 120 minuten een sterftecijfer van 97. Het groote aantal abnorme vormen, dat hier zoo spoedig aanwezig is (na 60 minuten reeds ongeveer 50 %), wijst er op, dat de aangegeven sterftecijfers zeker nog te klein zijn als gevolg van de oplossing van afgestorven bacteriën, waardoor een vermindering van de aantallen microscopisch telbare bacteriën tot stand komt. Evenals bij de lagere begintiters is ook hier derhalve een snelle toeneming van de intensiteit van afsterving in de opeenvolgende perioden van het proces te constateeren.

Vermeerdering der bacteriën (generatieduur). Volgens de reeds aangegeven methode wordt in Tabel XIX in de periode van 60 tot 90 minuten, onmiddellijk voorafgaande aan het maximum aantal levende bacteriën, een generatieduur berekend van 30 minuten, korter derhalve dan de normale. De intensiteit van vermeerdering der bacteriën is derhalve in deze periode belangrijk toegenomen.

Troebelheid. Indien bij een hoogere begintiter nog een vermeerdering van bacteriën plaats vindt, dan neemt ook de troebelheid nog toe. Dit is het geval bij begintiter 6 (Tabal XIX), daarentegen niet meer bij begintiter 8—9 (Tabel XX). Geruimen tijd na het bereiken van het maximale aantal microscopisch telbare bacteriën is de troebelheid het intensiefst. In Tabel XIX is de troebelheid na 120 en 150 minuten het intensiefst en na 90 minuten is het aantal microscopisch telbare bacteriën reeds maximaal; na 120 en 150 minuten is ook het aantal opgezwollen en korrelig-uitziende bacteriën het grootst. Deze abnorme vormen verklaren dus ook hier weder de nog toegenomen troebelheid, ondanks de vermindering van het aantal microscopisch telbare bacteriën.

De lysis komt bij hoogere begintiters vroeger dan bij lagere begintiters (Tabel XXI). De lysis komt 60—120 minuten na de maximale afsterving tot stand; reeds 30 minuten na de afsterving kan een bacterie opgelost zijn, zooals in Tabel XX blijkt uit de aantallen afgestorven bacteriën: 11820 onmiddellijk na de toevoeging van het lysin en 30 minuten daarna 7359.

Lysin-titer. Is bij een hooge begintiter een toeneming van het aantal levende bacteriën en derhalve ook van het aantal microscopisch telbare bacteriën te constateeren, dan wordt ook een lysinstijging waargenomen; in Tabel XIX is de titer van 6 tot 10 gestegen. Opmerkelijk is, dat in deze proefneming tijdens de lysis reeds de maximale titer bereikt wordt, hetgeen bij lagere begintiters niet het geval was. In Tabel XIX is van 0 tot 120 minuten een titerstijging tot 8 waarneembaar en van 120 tot 180 minuten, een periode, waarin geen vermeerdering, uitsluitend afsterving en oplossing van bacteriën tot stand komt, vindt men

een titerstijging van 8 tot 10. In Tabel XX is geen titerstijging, maar zelfs een titerdaling waarneembaar.

Titerstijging komt derhalve bij hooge begintiters alleen dan tot stand, indien nog een vermeerdering van bacteriën plaats vindt (Tabel XIX); een intensieve afsterving zònder vermeerdering van bacteriën voert niet tot een titerstijging (Tabel XX). Hieruit blijkt, dat de definitie van DOERR (pag. 8) niet geheel juist is, daar volgens deze omschrijving het lysin gedurende het lysisproces snel zou toenemen, hetgeen bij het proces met de hoogste begintiters geenszins het geval is. De conclusie van BORDET en CIUCA, dat de lytische werking en regeneratie van het lysin elkander steeds begeleiden, is dus eveneens onjuist.

Aan de hand van de verrichte proefnemingen is het verloop bij de titreermethode volgens APPELMANS geheel te verklaren. Bij de titreermethode toch volgens APPELMANS heeft men steeds met verschillende begintiters te doen. Onze lysaatbouillon had een titer 10; bij het bepalen van de sterkte van dit lysaat werden dus 10 verdunningen gemaakt, waarin achtereenvolgens alle initiale lysin-titers aanwezig waren van 9 tot en met 0; bij deze verdunningen werd een gelijke hoeveelheid 18-urige SHIGA-bouilloncultuur gevoegd; na een zekeren tijd waren deze buisjes volkomen helder. De Tabellen XXII, XXIII, XXIV en XXV geven een overzicht van eenige titreeringen volgens APPELMANS.

In de proefnemingen van Tabel XXII werden onmiddellijk na de samenvoeging van het lysin en de SHIGA-bouilloncultuur de aantallen kweekbare bacteriën, in die van Tabel XXIII zoowel de aantallen kweekbare als microscopisch telbare bacteriën vastgesteld. Bij de hoogste initiaaltiter van deze reeks proefnemingen, namelijk titer 9 (Tabel XXII), sterven alle SHIGA-bacillen onder inwerking van het bacteriophage lysin onmiddellijk af. Bij de hoogere titers, vanaf titer 4 tot 9, komt eveneens een momentane afsterving tot stand, welke geringer wordt, naarmate de begintiter lager is. Bij de lagere titers (4 tot en met 0) is uit Tabel XXII geen momentane afsterving af te lezen; de geringe verschillen (930, 900 en 970) met de contrôle (1010) vallen geheel binnen de foutgrenzen der methode.

In de eerste buisjes van de proefnemingen XXII, XXIV en XXV is aanvankelijk geen troebelheid waar te nemen; deze buisjes blijven helder. Van de proefneming XXIII, waar een grooter aantal SHIGA-bacillen in de buisjes werd gebracht, zijn de buisjes in den aanvang alle troebel, maar worden de eerste buisjes weder spoedig helder, zonder dat te voren de troebelheid waarneembaar is toegenomen. De overige buisjes met lagere begintiters worden na $1^1/_2$ tot $4^1/_2$ uren troebel (Tabellen XXII, XXIV en XXV) of sterker troebel (Tabel XXIII), afhankelijk van de hoeveelheid toegevoegde SHIGA-bouilloncultuur. De troebelheid treedt vroeger op of wordt vroeger intensiever dan in de contrôle-buisjes, waarin geen lysin aanwezig is. De lysis komt bij lagere initiaaltiters na langeren tijd tot stand dan bij hoogere; in Tabel XXII bv. komt de lysis bij begintiter 5 na 4 uren, bij begintiter 4 na 6 uren, bij begintiter 3 na 7 uren, bij begintiter 2 na 8 uren en bij begintiter 1 na $8^1/_2$ uur tot stand.

Van sommige buisjes is na 24 uren de eindtiter bepaald. De meeste buisjes, welke onderzocht zijn, bezitten alsdan de maximale titer; alleen de eerste buisjes (Tabellen XXII, XXIV) toonen na 24 uren geen titerstijging aan.

Het verloop bij de titreermethode volgens APPELMANS vertoont dus dezelfde verhoudingen als in onze proefnemingen met kolven met verschillende begintiters aangetroffen werd.

* * *

De microscopische veranderingen der bacteriën tijdens het lysisproces. De toepassing van de microscopische telmethode bood bij voortduring de gelegenheid de verschillende veranderingen, welke de bacteriën in de opeenvolgende phasen van het lysisproces ondergaan, nauwkeurig te bestudeeren. Bovendien stelde de vochtige kleurmethode volgens KLEIN, waarop de microscopische telmethode gebaseerd is, ons in staat, vooral in de latere stadia van het lysisproces, een groot aantal zeer fragiele bacteriënvormen waar te nemen, welke in de praeparaten, gemaakt volgens de KOCH'sche kleurmethode, zijn uiteengevallen en verdwenen.

TABEL XXII.

9 c.c. bouillon + $^1/_{10}$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin.

No.	Aantal kweekbare bact.	Troebelheid.		Lysin-titer.	
		Begin.	Eind.	Begin-titer	Eind-titer
I	0	helder	helder	9	9
II	260	helder	helder	8	
III	800	helder	nelder	7	
IV	680	helder	helder	6	
V	680	?	na 4 uren	5	10
VI	696	na 4 uren	na 6 uren	4	
VII	930	idem	na 7 uren	3	
VIII	900	idem	na 8 uren	2	
IX		idem	na $8^1/_2$ uur	1	10
X	970	idem		0	
C	1010	idem			

C = Contrôle met SHIGA-bouilloncultuur zonder lysin.

TABEL XXIII.

9 c.c. bouillon + 1 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + c.c. lysin.

No.	Aantal kweekbare bact.	Aantal levende bact.	Aantal microsc. telbare bact.	Afsterving.		Troebelheid.		Lysin-titer.	
				Aantal afgestorven bact.	Steriliteits-percentage.	Begin.	Eind.	Begin-titer	Eind-titer
I	1640	1976	9844	7868	80	Spoor troebel	na 2 uren	8	
II	3760	4530	11601	7071	61	idem	na 3 uren	7	
III	3720	4506	6680	2174	33	idem	na 4 uren	6	
IV	3600	4337	7383	3046	41	wordt na $1^1/_2$ uur sterker troebel	na $4^1/_2$ uur	5	
V			10195			idem	na $5^1/_2$ uur	4	
VI			9492			idem	na $7^1/_2$ uur	3	10
VII						idem		2	
VIII						idem		1	
IX						idem		0	
C			8789			idem			

TABEL XXIV.

9 c.c. bouillon + $^1/_{10}$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin.

No.	Troebelheid.		Lysin-titer.	
	Begin.	Eind.	Begintiter.	Eindtiter.
I	helder	helder	9	9
II	helder	helder	8	
III	helder	helder	7	
IV	helder	helder	6	
V	na 2 uren	na $4^1/_2$ uur	5	10
VI	idem	na $4^1/_2$ uur	4	
VII	idem	na $4^1/_2$ uur	3	10
VIII	idem	na 6 uren	2	
IX	idem	na 7 uren	1	
X	idem	na 9 uren	0	

TABEL XXV.

9 c.c. bouillon + $^1/_{10}$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin.

No.	Troebelheid.		Lysin-titer.	
	Begin.	Eind.	Begintiter.	Eindtiter.
I	helder	helder	9	
II	helder	helder	8	
III	helder	helder	7	
IV	na 2 uren	na $3^1/_2$ uur	6	
V	idem	na 5 uren	5	
VI	idem	na 5 uren	4	10
VII	idem	na 6 uren	3	
VIII	idem	na 8 uren	2	
IX	idem	na 9 uren	1	
X	idem	na $10^1/_2$ uur	0	

In het begin van de eerste periode van het lysisproces vertoonen de bacteriën nog den normalen vorm.

Ongeveer 60 tot 180 minuten na den aanvang van het proces, zijn de bacillen veel langer geworden dan normaal (zie pag. 57, figg. *a*, *b*, *c*, *d*) en zijn er in vergelijking met een SHIGA-bouilloncultuur van denzelfden ouderdom, zonder toevoeging van het bacteriophage lysin, veel meer deelingsvormen aanwezig.

Tegen het einde van de eerste periode, eenigen tijd derhalve, nadat meestal een duidelijk waarneembare afsterving heeft plaats gevonden, ziet men bacteriën optreden, welke een weinig zijn opgezwollen. Vooral 30—90 minuten na de maximale afsterving is het aantal van deze opgezwollen bacteriën belangrijk toegenomen en is tevens de zwelling der afzonderlijke bacteriën aanzienlijker geworden; men vindt alsdan alle stadia aanwezig van een nauwelijks waarneembare tot een omvangrijke zwelling, welke laatste de bacteriën wel een 10- tot 15-voudige normale grootte kan doen bereiken (figg. *e* tot en met *l*). De zwelling der bacteriën betreft nu eens het middengedeelte der bacteriën (figg. *e* tot en met *j*), zoodat zij een spoelvormige gedaante vertoonen, dan weer één der uiteinden, waardoor knotsvormen te zien zijn (figg. *k* en *l*). Opmerkelijk is, dat de opgezwollen bacteriën gelijkmatig en zeer intensief gekleurd zijn.

Op het oogenblik, dat het aantal opgezwollen bacteriën en de opzwelling maximaal zijn, ziet men vele korrelige vormen optreden, welke echter slechts zeer korten tijd blijven bestaan, zoodat zij alleen onder zeer gunstige omstandigheden duidelijk aantoonbaar gemaakt kunnen worden. Optimale condities zijn o.a. een lysisproces met lage initiaaltiter, het laten verloopen van het lysisproces bij 22° C. en vooral het gebruik maken van de vochtige kleurmethode van KLEIN. De korrels in het protoplasma zijn zeer intensief gekleurd, waardoor de bacterie een onregelmatige tinctie vertoont (figg. *o*, *p*, *q*, *r*, *s*). Dikwijls liggen verschillende van deze korrels naast de opgezwollen bacteriën; somwijlen liggen de korrels tegen de bacteriën aan (figg. *m* en *n*). Ook de grenzen der opgezwollen bacteriën zijn in dit stadium onregelmatig, gekarteld, ingekerfd (figg. *t* en *u*). Somwijlen zijn van

den bacil niets meer overgebleven dan enkele gekleurde puntjes, welke door protoplasmadraadjes samenhangen (figg. *v* en *w*).

Ten slotte zijn alleen nog subtiele overblijfselen, geraamten van bacteriën, aanwezig, welke geraamten zeer licht getingeerd zijn en waaraan somwijlen nog te zien is, dat de bacteriën in korrels zijn uiteengevallen (figg. *x*, *y* en *z*).

Bij hooge begintiters, waarbij geen bacteriëele vermeerdering optreedt, zijn deze abnorme vormen ook aanwezig en wel eveneens 30—90 minuten na de (momentane) afsterving. De abnorme vormen treden hier niet zoo uitgesproken en duidelijk op als in het verloop van het lysisproces met lagere begintiter; de zwelling der bacteriën is niet zoo intensief en de gekorrelde vormen treden minder op den voorgrond.

Microscopische veranderingen der bacteriën tijdens het lysisproces.

(Schematische teekening).

a: normale bacil.
b, *c*, *d*: langere vormen.
e: matige zwelling.
f, *g*: 2 dochtercellen, die beide opgezwollen zijn.
h: maximale zwelling.
i, *j*: 2 dochtercellen, waarvan de eene normaal en de andere opgezwollen is.
k, *l*: de zwelling betreft voornamelijk een uiteinde.
m, *n*: korrels liggen tegen de bacteriën aan.
o, *p*, *q*, *r*, *s*: korrelige inhoud, onregematig getingeerde bacteriën.
t, *u*: onregelmatige grenzen van opgezwollen bacteriën.
x, *y*, *z*: geraamten van bacteriën.

HOOFDSTUK II.

Invloed van de bacterie op de bacteriophage lysis in vloeibaar milieu.

De bacterie en het bacteriophage lysin vormen de beide reactiecomponenten bij het lysisproces; zonder bacterie is nog geen bacteriophaag lysin aangetoond kunnen worden. Maar niet de bacterie als zoodanig is voldoende; deze moet aan bepaalde eischen voldoen.

Sensibiliteit. De bacterie moet in de eerste plaats sensibel, vatbaar zijn voor de werking van het bacteriophage lysin. Bijzonder vatbaar voor het lytisch proces zijn dyserentiebacillen, typhusbacillen, colibacillen, staphylococeen e. a. Van zeer vele bacteriënsoorten daarentegen heeft men niet kunnen aantoonen, dat zij gelyseerd kunnen worden. Maar ook van een en dezelfde bacteriënsoort worden dikwijls stammen aangetroffen, die niet, en andere, die wel sensibel zijn. Zoo vond ZDANSKY (45) o.a., dat de buiten het dierlijk organisme voorkomende coli niet sensibel is, terwijl de darmcoli altijd min of meer vatbaar is voor lytische inwerking. Zelfs in één zelfden stam, in één zelfde cultuur, hebben sommigen (GRATIA 49, KUTTNER 54, e. a.) nog verschillende variëteiten gevonden ten opzichte van de lytische inwerking, voornamelijk ten aanzien van de terminale phase, de lysis. Waaraan deze verschillen in vatbaarheid toegeschreven moeten worden, is nog niet bekend.

Behalve de natuurlijke resistentie is er ook nog een verworven resistentie. Indien een opgeloste bouilloncultuur eenigen tijd blijft staan, ontwikkelt zich dikwijls vroeg of laat een z.g. secun-

daire cultuur, welke bestaat uit bacteriën, die zijn blijven leven, zijn gaan groeien en thans resistent tegen de lytische inwerking blijken te zijn. Deze resistentie is niet altijd absoluut, want bij verhooging van de titer kan somwijlen de resistentie weer verdwijnen.

D'HERELLE (6, 7) meende, dat de resistentie ontstaat, indien het bacteriophage lysin minder virulent is. De resistentie zelf berust volgens hem hierop, dat de resistente bacteriën anti-lytische eigenschappen hebben verkregen; zij scheiden anti-lysin af. (D'HERELLE is immers van meening, dat de bacteriophaag door middel van een ferment, lysin genaamd, zijn werking uitoefent).

G. ELIAVA en E. POZERSKI (46) vonden bij het uitstrijken van een mengsel van lysin en bacterie op een scheefagarvlakte, dat alleen op het bovenste uitgedroogde gedeelte van den voedingsbodem bacteriën opkwamen. Deze bleken zeer resistent te zijn, welke resistentie na eenige passages verminderde en ten slotte verdween. Ook zij schreven de resistentie toe aan de mindere virulentie van den bacteriophaag.

Anderen weer beschuldigden de bacteriën. Zoo zegt BAIL (47), dat sommige stammen gemakkelijker resistente kiemen leveren dan andere.

GRATIA (48, 49, 50, 51, 52, 69) kon een coli-cultuur splitsen in sensibele en resistente variëteiten. Na inwerking van het bacteriophage lysin zou derhalve de reeds van den aanvang af bestaande resistentie der cultuur slechts versterkt zijn, hetgeen volgens GRATIA tot stand zou komen door een selectie ten gevolge van de lytische inwerking, waardoor de resistente bacteriën wegens het opgelost worden der sensibele kiemen de overhand verkrijgen. Hij was zelfs in staat 12 coli-variëteiten te isoleeren, elk met een andere gevoeligheid voor het bacteriophage lysin.

ARKWIGHT (53) toonde aan, dat in elken bacteriënstam van de typhus-coligroep minstens 2 variëteiten aanwezig waren, één variëteit, die in bouillon samenklonterde en lyso-resistent was en een andere variëteit, die in bouillon een diffuse troebelheid veroorzaakte en lyso-sensibel werd bevonden.

Ook W. Seiffert (10) stelt de bacterie verantwoordelijk voor het ontstaan en het varieeren van de resistentie.

A. Kuttner (54), die evenals Bruynoghe en Maisin (55) nooit complete sterilisatie kreeg, meende, dat door inwerking van het bacteriophage lysin 3 typen voor den dag traden, die in de emulsie prae-existeeren, nl. een zeer sensibele, een gewoon sensibele en een resistente variëteit.

Bordet en Ciuca (55) bestudeerden evenals Gratia de coli-variaties en onderscheidden 2 typen met verschillende overgangen; zij zijn echter van meening, dat deze typen juist ontstaan door de inwerking van het bacteriophage lysin, waardoor de bacterie geheel nieuwe eigenschappen verkrijgt.

Ter verklaring van de verworven resistentie staan derhalve tegenover elkander: de adaptatie-theorie (aanpassing van sensibele bacteriën aan het bacteriophage lysin) en de selectie-theorie van Gratia (relatieve vermeerdering van reeds van den aanvang af aanwezige natuurlijk resistente kiemen).

W. Gohs (141) heeft een geheel andere meening over het ontstaan van resistente kiemen. Hij meende opgemerkt te hebben, dat speciaal bij aanwezigheid van groote hoeveelheden bacteriophaag lysin (hoogste titers) de resistente kiemen ontstaan. Volgens hem is de lysis een fermentatief proces, dat zoodanig tot stand komt, dat het bacteriophage lysin (dat hij lysokinase noemt) het protoplasma losmaakt en de celfermenten activeert, waardoor deze de cel tot oplossing kunnen brengen. Dit fermentatief proces komt volgens hem bij een bepaalde (hoogste) concentratie van de splitsingsproducten der bacteriën, tot welke splitsingsproducten ook de lysokinase zelf behoort, tot stilstand; daarom ontstaan de resistente kiemen juist bij de hoogste concentraties van het bacteriophage lysin. Volgens zijn opvatting van de lysis wordt het ontstaan van de resistente bacteriën dan zóó verklaard, dat er veel lysokinase in de bacterie-cel komt; deze groote hoeveelheid lysokinase zal chemisch aan verschillende deelen der bacterie-cel gebonden worden, waardoor deze deelen aan de ge-activeerde celfermenten weerstand kunnen bieden en aldus aan de oplossing ontkomen.

Er zijn verschillende omstandigheden bekend, waardoor het ontstaan van resistente bacteriën bevorderd of geremd kan worden.

D'HERELLE kon door toevoeging van lood- en zilverzouten het ontstaan van resistente kiemen bevorderen en door toevoeging van magnesiumsulfaat juist remmen.

Volgens DOERR, BAIL, e. a. bevordert gelatine en agar-agar het ontstaan van resistente kiemen.

Volgens IZAR (57) is de afwezigheid van zuurstof een belemmerende factor: in toegesmolten buisjes wordt het ontstaan van resistente kiemen tegengegaan.

BRUTSAERT (58, 59) vond in zoutrijk milieu een grootere gevoeligheid van de bacteriën voor het bacteriophage lysin, zoodat in een dergelijk milieu de resistente vormen weinig optraden.

Volgens eigen onderzoekingen (zie pag. 117) moet ook ongetwijfeld de temperatuurgraad, waarbij het lysisproces verloopt, invloed hebben op het ontstaan van resistente vormen en wel zóódanig, dat bij lagere temperaturen (22° C.) veelvuldiger en vroeger resistente kiemen optreden dan bij hoogere temperaturen (37° C., 40° C., 44° C.). Bleven de buisjes bij 37° C. staan, dan duurde het, indien een secundaire cultuur optrad, weken en maanden; bij 22° C. kwam na 2 à 3 dagen gewoonlijk reeds een secundaire troebelheid voor den dag. Werden culturen, die bij 37° C., 40° C. of 44° C. gelyseerd waren, bij kamertemperatuur bewaard, dan kwam de secundaire cultuur nu eens na enkele weken, dan weer na maanden te voorschijn, terwijl verschillende van deze culturen na 16 maanden nog steeds helder gebleven zijn.

Grootere aantallen bacteriën bevorderen eveneens het ontstaan van resistente kiemen, hetgeen onder meer toegeschreven moet worden aan het grootere aantal aanwezige prae-existeerende resistente kiemen (zie pag. 84).

Het verkrijgen van resistentie gaat gepaard met een verandering van verschillende morphologische en biologische eigenschappen. D'HERELLE (6) reeds wees op de groote polymorphe vormen, de coccusvormen, ook op het bestaan van een soort kapsel bij de resistente kiemen; dikwijls werden de bacteriën ook knotsvormig. DOERR nam eveneens een slijmkapsel aan bij de resistente kiemen.

SEISER (29) echter deelde mede deze kapsels nooit te hebben kunnen zien. In tegenstelling met SEISER hebben wij deze kapsels microscopisch wel waargenomen. Waar de bacteriën op een scheefagarvlakte een slijmig, dradentrekkend beslag geven en in de bouilloncultuur samengeklonterde massa's vormen („culture agglutinée" van D'HERELLE 6, 46), daar bewijst zulks voldoende de toegenomen slijmproductie. Slijm nu, als zijnde een colloid, remt de lytische werking (BAIL).

Behalve de vormen van de bacteriën zijn ook de koloniën der resistente kiemen gemodificeerd. OTTO en MUNTER (60, 61) beschreven deze koloniën als glazig, kruimelig, onregelmatig van omtrek en oppervlakte, ingekerfd en hoefijzervormig.

GILDEMEISTER (62, 63, 64) noemde deze koloniën „Flatterformen", omdet deze vormen bij het voortkweeken zoo labiel zijn („flattern"). Hij heeft deze „Flatterformen" reeds in 1917 ontdekt, zonder toen nog iets van het bestaan van een bacteriophaag lysin te weten; later heeft hij deze koloniën echter ook juist geïnterpreteerd als veroorzaakt te zijn door bacteriën, die onder inwerking van het lysin resistent geworden waren.

W. C. DAVISON (65, 66) sprak van „moth eaten colonies", waarmede hij wilde aangeven, dat gedeelten van de koloniën gelyseerd zijn.

GRATIA (68, 70) en TWORT (67) vonden, dat de oorspronkelijk goudgele koloniën van den staphylococcus aureus er wit uitzagen, indien de staphylococcen tegen lytische inwerking resistent geworden waren.

Omtrent de veranderingen van biologische eigenschappen meldde d'HERELLE (6, 71, 72) het inagglutinabel worden, het resistent zijn tegen phagocytose en overigens, in het algemeen, het bezit van een groote vitaliteit en hooge virulentie; alleen door de complementbindingsproef zou de identiteit van de resistente kiemen met de oorspronkelijke bacteriën aangetoond kunnen worden. BORDET (73, 74) vond de resistente kiemen eveneens bestand tegen phagocytose en serumvast; anderen echter ontkenden zulks. OTTO en MUNTER (61) zagen den CONRADI-DRIGALSKI-voedingsbodem min of meer rood worden, indien daarop resistente

typhusbacillen of resistente dysenterie-FLEXNER-bacillen geënt werden. BERGSTRAND (75, 76) merkte op, dat de resistente dysenterie Y-bacil den ENDO-voedingsbodem rood maakte; de koloniën waren slijmig en de bacillen slecht kleurbaar. DOERR (61) constateerde bij resistente colibacillen het ontbreken van gasvorming in glucosehoudende voedingsbodems.

Behalve het kenmerkende van een verhoogd weerstandsvermogen ten opzichte van het bacteriophage lysin, hebben de resistente bacteriën volgens sommigen (OTTO 61, e.a.) veelal het vermogen, om het bacteriophage lysin te produceeren, d.w.z. zijn de resistente bacteriën gelijktijdig lysogeen; volgens anderen (d'HERELLE, BRUYNOGHE, MAISIN, e.a.) heeft men hier te doen met een adsorptie van het bacteriophage lysin aan de bacteriën.

De resistente, witte koloniën gevende, goudgele staphylococcen van GRATIA en TWORT waren ook lysogeen.

GILDEMEISTER toonde aan, dat de bacillen der z.g. „Flatterformen" dragers van het bacteriophage lysin waren.

APPELMANS (77) deed eveneens mededeeling van een resistenten paratyphus A-stam, die lysogeen was.

Tal van andere onderzoekers hebben nog op de lysogeniteit van lyso-resistente bacteriën gewezen.

Het lysogeen karakter, zoo zeide DOERR (17), uit zich hierin, dat de kiemen in vloeibare media, zoodra zij zich vermeerderen, lysin produceeren; zij hebben potentiëele lytische energie, die zij bij de vermeerdering in kinetische omzetten.

DAVISON (65) constateerde, dat het filtraat van een peptonwatercultuur van „moth eaten colonies", in tegenstelling met het filtraat van een peptonwatercultuur van normale kiemen, sterk lytisch werkte.

A. SEISER (29) zag, dat bij overenten van een lus uit een secundaire, intensief troebel geworden cultuur het aantal „Flatterkolonies" veel te gering was ten opzichte van de intensiteit van de troebelheid; enkele platen bleven zelfs somwijlen geheel steriel. Microscopisch constateerde hij, dat van 2 staafjes, nadat zij gedeeld waren, van ieder paar één dochtercel werd opgelost. Op een deel der dochtercellen werd volgens hem de resistentie over-

geërfd, een ander deel werd gelyseerd en leverde het lysin. Op grond van deze proefnemingen meende hij de opvatting te kunnen bevestigen, dat lyso-resistente kiemen lysin kunnen produceeren.

Volgens OTTO (61) zijn lyso-resistente bacteriën niet altijd lysogeen. DOERR neemt eveneens aan, dat lyso-resistentie en lysogeniteit niet altijd samengaan; hij vond de eerste lysogene stammen reeds na 150 minuten (in het begin der lysinstijging) en de eerste resistente stammen na 210 minuten (nà het begin van het bacteriënverval). Lyso-resistente kiemen zijn derhalve volgens de juist genoemde onderzoekers dikwijls, maar niet altijd lysogeen.

Sommige lysogene stammen kunnen na honderden overentingen nog het bacteriophage lysin doen vrijkomen (PONDMAN 80). DOERR vond, dat de lysogeniteit der resistente kiemen somwijlen noch door afwasschen, noch door centrifugeeren, te verwijderen was, aldus in het licht stellende, dat de lysogeniteit zeer innig met de resistente kiemen verbonden kan zijn. SEISER (29) heeft aangetoond, dat het bacteriophage lysin via de gevoelige kiemen in de cultuur bewaard kan blijven; hij zag bij uitstrijken van een cultuur van lysogene bacteriën op agar-agar somwijlen „taches" optreden. FLU (81, 82) toonde aan, dat het bacteriophage lysin ook latent *in* de resistente individuen aanwezig kan zijn, zonder zijn werking te openbaren. Eerst door de cultuur flink met Na_2SO_4 te verwrijven en te filtreeren, kon hij in het filtraat het bacteriophage lysin aantoonen. Waar FLU door zijn methode de lysogene bacteriën lysin-vrij, of, zooals hij zelf zegt „ultrarein" verkregen heeft en met zoodanige culturen nooit meer spontaan „bacteriophaag"-werking kon doen optreden, meende hij hiermede bewezen te hebben, dat het onmogelijk is uit voldoend gezuiverde culturen lytische werking te voorschijn te doen komen. BOTEZ (83), LISBONNE en CARRÈRE (84, 85, 86), WEINBERG en AZNAR (87, 88), PICO (89, 90, 91, 92), FABRY (93, 115), GILDEMEISTER (63), BAIL (94), OTTO (95) e. a., die allen in bacteriënculturen, welke volgens deze onderzoekers nooit met lysin in aanraking waren geweest, niettemin het bacteriophage lysin wisten aan te toonen, werkten volgens FLU (en PONDMAN) met onzuivere culturen.

De geaardheid van de resistentie onderzoekend, vonden APPELMANS en WAGEMANS (96), dat sommige bacteriën, welke resistent waren geworden ten opzichte van een bepaald bacteriophaag lysin, door andere bacteriophage lysinen wèl opgelost werden en omgekeerd bacteriën, tegenover de laatste bacteriophage lysinen resistent geworden, door het eerste lysin nog wèl gelyseerd werden; volgens hen wijst dit er op, dat het resistent worden der bacteriën niet berust op veranderingen van het bacteriophage lysin, maar op processen, die zich in het bacteriënprotoplasma afspelen. J. MAISIN (55, 97, 98) bevestigde de meening van APPELMANS en WAGEMANS, dat hetzelfde bacteriophage lysin op de eene resistente bacterie somwijlen totaal geen invloed heeft en op een andere wel. OTTO (61) en BRUYNOGHE (55, 99) sloten zich eveneens bij hen aan. O. NAKAMURA (61) vond de SHIGA-resistentie zeer specifiek, alléén resistent tegen het gebruikte lysin. GRATIA, TWORT, ARKWIGHT en anderen vonden, dat in één zelfde cultuur verschillende variëteiten voorkwamen, waarvan één of meer resistent bleken te zijn tegen het lysin. Deze resistente variëteiten wilde SCHUURMAN (23) uitschakelen. Om dat doel te bereiken, entte hij den bacteriënstam op 3 % agar-agar, zoodanig, dat hij goed geïsoleerde koloniën verkreeg, en onderzocht de bacteriën van deze verschillende koloniën op haar gevoeligheid voor het bacteriophage lysin. Hij nam nu eerst de bacteriën uit de meest gevoelige koloniën en liet daarop het bacteriophage lysin inwerken; door passage op telkens minder gevoelige variëteiten kon hij ten slotte met zijn bacteriophaag lysin den geheelen oorspronkelijken stam lyseeren. Met deze aanpassingsmethode via koloniën van den minsten weerstand, slaagde hij er derhalve in de werking van het bacteriophage lysin zóódanig te verhoogen, dat van resistentie der bacteriën geen sprake meer was.

De resistente kiemen kunnen haar resistentie weder verliezen. Dit verlies van resistentie gaat gepaard met terugkeer tot den vroegeren vorm en van de oorspronkelijke eigenschappen.

A. KUTTNER (54) maakte een resistente cultuur sensibel door telkens over te enten op agar-agar van stijgende alcaliciteit ($P_H = 7.6$ tot 9).

Door herhaald overenten (15 keer) konden ook G. ELIAVA en

E. Pozerski (46) de resistente bacteriën sensibel en normaal krijgen. Zij verrichtten deze overentingen zóódanig, dat zij steeds de bacteriën namen van het bovenste, uitgedroogde gedeelte van den scheefagar.

Lysin-vrij en tevens niet meer resistent verkregen Bordet en Ciuca (56) de kiemen door over te enten op agar-agar, waaraan anti-lytisch serum was toegevoegd (een dergelijk serum wordt bereid door een dier met het bacteriophage lysin voor te behandelen). Volgens Schuurman berust deze werking op een neutraliseeren van het bacteriophage lysin dezer lysogene en resistente kiemen.

Appelmans (77) constateerde, dat zijn resistente, lysogene paratyhus A-stam, ingespoten in het dierlijk organisme en na enkele dagen weder uit het bloed gecultiveerd, de lysogeniteit en de resistentie had verloren.

Uit al deze waarnemingen blijkt derhalve, dat de resistentie geen blijvende eigenschap is.

In strijd hiermede geeft Bail (100) een geheel andere beschouwing over de resistentie, welke beschouwing samenhangt met de opvatting van Bail over het wezen van het bacteriophage lysin. Sommigen noemen deze opvatting van Bail geniaal, anderen daarentegen fantastisch. Bail (101, 102, 103) is namelijk van meening, dat het bacteriophage lysin een deel van de generatieve substantie der bacterie-cel voorstelt, dat als splinter losraakt en gedeeltelijk nog functioneeren kan. De generatieve substantie heeft twee vermogens: kernoplossing en kernopbouw. Van die beide vermogens nu heeft de splinter (het bacteriophage lysin) alleen het vermogen tot kernoplossing behouden. Komt de splinter nu bij een zich vermeerderende bacterie-cel, dan berooft hij ook deze van haar kernopbouwend vermogen; er blijft een nieuwe splinter met kernoplossend vermogen achter. Zulke veranderingen betreffen niet de totale generatieve substantie, maar betrekkelijk zelfstandige deelen er van, die waarschijnlijk te vergelijken zijn met de chromosomen der hoogere cellen. Toch kan het somwijlen gebeuren, dat een bacterie, door het bacteriophage lysin aangevallen, niet te gronde gaat, maar met haar overblijvende gene-

ratieve substantie een nieuw bacterie-lichaam opbouwt, dat dan niet meer die groep bevat, waarop het bacteriopghage lysin zijn aangrijpingspunt heeft. Deze bacteriën zijn volgens BAIL de resistente kiemen, die hij dan verliesmutanten noemt. De resistentie zou dan een blijvende eigenschap zijn, hetgeen echter in strijd is met bovengenoemde onderzoekingen.

Uit de mogelijkheid, dat resistente bacteriën na herhaalde overentingen (het aantal overentingen, daarvoor noodig, varieert sterk) de resistentie kunnen verliezen, besluit SCHUURMAN, dat de resistentie niet alleen op selectie (GRATIA) kan berusten.

Uit de voorgaande beschouwingen blijkt wel voldoende, dat er nog zeer veel ontbreekt aan onze kennis omtrent de oorzaken en de geaardheid der resistentie. Ter demonstratie van deze meening wijzen wij o.a. nog op een waarneming van A. KUTTNER (54), die een cultuur, welke gedurende 6 maanden herhaaldelijk overgeënt was, plotseling resistent zag worden, terwijl een vroegere overenting van dezelfde oorspronkelijke cultuur langer dan één jaar sensibel bleef. Wij hebben een analoge ervaring opgedaan. Onze laboratorium-SHIGA-stam, toevalligerwijs voor een titerbepaling gebruikt, bleek resistent te zijn, terwijl een vroegere overenting van dezen stam met hetzelfde bacteriophage lysin een titer 9 gaf. Wy hebben deze proefneming eenige malen herhaald, steeds met hetzelfde resultaat. Ook OTTO (61), JANZEN, KRAUS, GOMEZ (104) en GRATIA melden een spontaan resistent worden.

In de buisjes van de verdunningsreeks volgens APPELMANS werd eenige weken na het voltooien van het lysisproces zeer dikwijls een bezinksel aangetroffen. Dit bezinksel werd door ons nader onderzocht. Met de vochtige kleurmethode volgens KLEIN werd gevonden, dat bijna alle aanwezige SHIGA-bacillen, waaruit dit bezinksel bleek te bestaan, min of meer opgezwollen waren, knotsvormig, veelal een kapsel bezaten en voorts ook langer waren dan normaal; sommige bacteriën vertoonden een ongelijkmatige kleurbaarheid, zoodat min of meer intensief getingeerde gedeelten van het bacterie-lichaam afwisselden met totaal onge-

kleurde plaatsen, andere bacteriën weder gaven ongelijkmatige, als het ware aangeknaagde contouren te zien. Op agarplaten ontwikkelden zich uit dit bezinksel z.g. „Flatterformen"; bij deze enting op agarplaten bleek evenals in de proefnemingen van A. SEISER, dat het aantal „Flatterformen", dat zich ontwikkelde, veel geringer was dan het aantal overgeënte individuen: van de duizenden bacteriën, die zich in het overgebrachte materiaal bevonden, hadden slechts 3 tot het ontstaan van koloniën aanleiding gegeven. Enting van bovengenoemd bezinksel in bouillon deed dezen niet troebel worden. De titerbepaling van den lysaatbouillon, waarin het bezinksel was aangetroffen, leverde somwijlen een titer 10 op en in andere gevallen een titerdaling tot 7.

Het ontstaan van resistente kiemen wordt door toevoeging van *geringe* hoeveelheden bacteriophaag lysin bevorderd. In een kolf met 100 c.c. bouillon werden 5 c.c. eener 18-urige SHIGA-bouilloncultuur en 1 c.c. lysaat (titer 2—3) gebracht. De kolf werd daarna in den thermostaat bij 37° C. geplaatst.

TABEL XXVI.

100 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 2—3).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microscopisch telbare bacteriën.	Verhoudingsgetal.
60	7000	7400	95
150	21000	28000	80
180	40000	44500	90
240	88000	123046	70
300	ontelbaar	ontelbaar	—

De verhouding van het aantal kweekbare bacteriën ten opzichte van het aantal microscopisch telbare bacteriën (verhoudingsgetal), blijkt ongeveer dezelfde te zijn als in SHIGA-bouillonculturen zonder bacteriophaag lysin; een eenigszins belangrijke afsterving van bacteriën is derhalve niet opgetreden. Na 300 en 330 minuten

werden echter ongeveer alle vormen microscopisch abnormaal gevonden; op agarplaten ontwikkelden zich „Flatterformen". De bacteriën waren derhalve resistent geworden.

Toestand van de bacterie. De bacterie moet in levenden toestand verkeeren. De meeste onderzoekers zijn van meening, dat doode bacteriën (tenzij de dood der bacteriën door het bacteriophage lysin zelf veroorzaakt wordt) niet opgelost worden. Enkele onderzoekers twijfelen hieraan (JOETTEN 105, e. a.). Ook GRATIA en RHODES (106) meenen, dat doode staphylococcen gedeeltelijk gelyseerd worden. Met het oog op de groote beteekenis, welke deze kwestie voor de beoordeeling van de werking van het bacteriophage lysin bezit, hebben wij dienaangaande een nader onderzoek met SHIGA-bacillen en SHIGA-lysin ingesteld.

Aan 18-urige SHIGA-bouillonculturen, waarvan de bacteriën door verwarming gedurende $^1/_2$ uur op 58° C. gedood waren (contrôles in bouillon en op agarplaten toonden de steriliteit aan), werden verschillende hoeveelheden bacteriophaag lysin (middelmatige, hooge titer) toegevoegd, waarna deze lysin-houdende culturen in den thermostaat bij 37° C. geplaatst werden; totale, noch partiëele lysis werd aangetroffen.

Ook werden voor dit doel langs natuurlijken weg gedoode bacteriën genomen, d.w.z. SHIGA-bacillen van zeer oude bouillonculturen, waarin (door de plaatmethode gecontroleerd) nagenoeg alle bacillen afgestorven waren; toevoeging van grootere en kleinere hoeveelheden bacteriophaag lysin veroorzaakte ook hier tijdens het verblijf in den thermostaat bij 37° C. noch totale, noch partiëele lysis.

Daar de beoordeeling van een geringe vermindering van troebelheid (partiëele lysis) uiterst moeilijk is, werd thans gebruik gemaakt van de microscopische telmethode van KLEIN, door welke methode wij in de gelegenheid waren reeds een zeer geringe daling (oplossing) van het aantal afgestorven bacteriën te kunnen constateeren.

Een 18-urige SHIGA-bouilloncultuur (9 c.c.) werd gedurende $^1/_2$ uur op 58° C. verwarmd (contrôles op de steriliteit in bouillon

en op agarplaten); na de verwarming werd 1 c.c. lysin (titer 10) toegevoegd. Onmiddellijk na deze toevoeging werd het aantal microscopisch telbare bacteriën vastgesteld. Vervolgens werd het buisje in den thermostaat bij 37° C. geplaatst en na een 3-urig en 24-urig verblijf bij die temperatuur werden opnieuw de aantallen microscopisch telbare bacteriën bepaald. Onmiddellijk na de toevoeging van het bacteriophage lysin werden per platinalus 277 732 bacteriën aangetroffen, na 3 uren 291 179 en na 24 uren 290 000. Het blijkt dus met zekerheid, dat het aantal doode bacteriën niet verminderd en derhalve geen spoor van lysis tot stand gekomen is; ook de vormen der bacteriën waren niet veranderd.

Deze zelfde proefneming werd genomen met een 24-urige SHIGA-agarcultuur. De bacillen werden in 0.9 % NaCl-solutie gesuspendeerd en, na verwarming gedurende $^1/_2$ uur op 58° C. (contrôles op steriliteit), werd bacteriophaag lysin toegevoegd; de emulsie werd in den thermostaat bij 37° C. geplaatst. Met een 8 maanden oude SHIGA-agarcultuur, waarvan alle bacillen dood waren, werd deze proefneming op dezelfde wijze herhaald. In beide proefnemingen nu was geen vermindering van het aantal microscopisch telbare bacteriën onder den invloed van het bacteriophage lysin te constateeren; evenmin kon microscopisch eenige verandering van de bacteriën opgemerkt worden.

Een dergelijke proefneming werd ook uitgevoerd met een zeer jonge (8-urige) SHIGA-bouilloncultuur. De jonge bouilloncultuur werd 10-voudig met sterielen bouillon verdund en daarna gedurende $^1/_2$ uur op 58° C. verwarmd (contrôles op steriliteit). Aan 9 c.c. van deze verdunde en verwarmde cultuur werd 1 c.c. lysin (titer 10) toegevoegd en door middel van de microscopische telmethode van KLEIN het aantal bacteriën vastgesteld; daarna werd het buisje in den thermostaat bij 37° C. geplaatst. Tevens werd daarnaast als contrôle genomen een onverdunde, gedurende $^1/_2$ uur op 58° C. verwarmde (steriele) SHIGA-bouilloncultuur zonder bacteriophaag lysin en ook daarin werd onmiddellijk na de verwarming het aantal microscopisch telbare bacteriën vastgesteld; dit buisje werd vervolgens eveneens bij 37° C. gesteld. Na 4 en

24 uren werden in beide emulsies de aantallen microscopisch telbare bacteriën opnieuw bepaald. In de emulsie met het bacteriophage lysin werden terstond na de toevoeging van het lysin per lus 15 117 bacteriën vastgesteld, na 4 uren 14 414 en na 24 uren 13359; in de contrôle-emulsie per lus respectievelijk 112500, 116010 en 106000 bacteriën. De aantallen microscopisch telbare bacteriën waren derhalve niet veranderd; ook qualitatief vertoonden de bacteriën geen wijziging. De doode bacteriën worden derhalve niet opgelost.

Vervolgens werd nagegaan, of wellicht de door verwarming gedoode bacteriën, tijdens het lysisproces toegevoegd, opgelost konden worden. Kolven met verschillende hoeveelheden bouillon (100 c.c., 150 c.c. of 200 c.c.) werden met 5 of 10 c.c. eener 18-urige SHIGA-bouilloncultuur en 1 c.c. lysin met uiteenloopende titer (4 of 5) gemengd. Onmiddellijk na de toevoeging van het bacteriophage lysin werden de aantallen kweekbare en microscopisch telbare bacteriën vastgesteld en de titer bepaald; daarna werden de kolven in den thermostaat bij 37° C. geplaatst. Op het tijdstip, waarop vermoed kon worden, dat het proces in vollen gang was (105, 120 of 180 minuten nà den aanvang) werden deze bepalingen herhaald. Onmiddellijk na deze laatste bepalingen werden de vloeistoffen in 2 gelijke deelen gesplitst (Tabellen XXVIII en XXIX); bij het eene gedeelte (A) werd 5 c.c. steriele bouillon gevoegd en bij het andere gedeelte (B) 5 c.c. eener SHIGA-bouilloncultuur, waarvan de bacillen door verwarming gedurende $^1/_2$ uur op 58° C. (contrôles op steriliteit) gedood waren. Onmiddellijk na de toevoeging van bouillon (A) en gedoode SHIGA-bacillen (B) werden beide vloeistoffen op het aantal kweekbare en microscopisch telbare bacteriën, benevens het lysingehalte (titer) onderzocht. De vloeistoffen werden vervolgens weder in den thermostaat bij 37° C. geplaatst. Op verschillende tijdstippen tot en met de lysis (ook de intensiteit van troebelheid werd nauwkeurig genoteerd) werden deze bepalingen herhaald. Bij één van deze proefnemingen (Tabel XXVII) werd de vloeistof niet in 2, maar in 3 gelijke deelen gesplitst; bij het eene deel (A) werd 5 c.c. steriele bouillon, bij het tweede deel (B) 5 c.c.

gedoode SHIGA-bacillen en bij het derde deel (C) 5 c.c. levende SHIGA-bacillen (18-urige bouilloncultuur) gevoegd. De vloeistoffen van elk van deze drie deelen, weder bij 37° C. geplaatst, werden onmiddellijk na de toevoeging van bouillon of bacillen, en verder op verschillende tijdstippen daarna, onderzocht op het aantal kweekbare en microscopisch telbare bacteriën en lysin-titer.

Kweekbare bacteriën. Het aantal kweekbare bacteriën is in Tabel XXVII tot aan de splitsing toegenomen; nà de splitsing (na 105 minuten) in 3 deelen blijft het aantal kweekbare bacteriën

TABEL XXVII.

150 c.c. bouillon + 10 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 4).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Troebelheid.	Lysin-titer.	
0	3840	5273	++	1 à 2	
105	14200	16699	+++	3	
165	21600	47109	+++++	4	A. 50 c.c. + 5 c.c. steriele bouillon.
345	5	18633	+++		
405	0	—	0		
105	15000	36847	++++	2	
165	23760	62933	++++++	3	B. 50 c.c. + 5 c.c. gedoode SHIGA-bouilloncultuur.
345	50	36211	++++++		
405	50	35508	++++++		
435			++++++		
495	1	16328	++		
105	28400	34453	++++		
165	36000	74535	++++++	4	C. 50 c.c. + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur.
345	300	65039	++++++		
405	0	13711	++++++		
435		weinig	+ ?		
495	2	weinig	+ ?		

TABEL XXVIII.

200 c.c. bouillon + 10 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 4).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Troebelheid.	Lysin-titer.	
0	4000		+	2	
210	1090	17919	++		
210	1090	17919	++		
300	310	5859	+++		A. 100 c.c. +
420	5	2109	++		5 c.c. steriele bouillon.
450			0		
480		enkele	0	9	
210	960	25012	+++		
300	410		+++		
420	5	13008	++++		B. 100 c.c. +
480	10	5977	++++	9	5 c.c. gedoode
510			+ tot 0		SHIGA-bouilloncultuur.
540	2		+ tot 0	10	
600	14	6328	+ tot 0	10	

TABEL XXIX.

100 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 5).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Troebelheid.	Lysin-titer.	
0	3250	5625	+	3	
180	0	—	0	6	
180	0		0	6	A. 50 c.c. +
270			0	10	5 c.c. steriele bouillon.
180	0	9843	+	6	B. 50 c c. +
270			+	10	5 c.c. gedoode
390		8437	+		SHIGA-bouilloncultuur.

in alle 3 vloeistoffen (A, B en C) nog toenemen; het lytisch proces verkeert hier tijdens de splitsing derhalve in de eerste periode. In Tabel XXVIII is het aantal kweekbare bacteriën op het moment der splitsing (na 210 minuten) reeds verminderd; nà de splitsing blijft het aantal kweekbare bacteriën nog afnemen: het proces verkeert hier derhalve in het begin van de tweede periode. In Tabel XXIX is het proces op het tijdstip der splitsing (na 180 minuten) reeds tot volledige lysis gevorderd.

Door de toevoeging van gedoode bacteriën wordt het aantal kweekbare bacteriën niet beïnvloed (Tabellen XXVII B en XXVIII B).

De toevoeging van levende bacteriën (Tabel XXVII C) is oorzaak, dat ook na 165 en 345 minuten het aantal kweekbare bacteriën grooter wordt bevonden. Evenwel 60 minuten later (na 405 minuten) zijn in geen van beide vloeistoffen, noch in de vloeistof mèt toevoeging van levende bacillen (C), noch in de vloeistof zonder toevoeging van bacteriën (A), kweekbare kiemen meer aanwezig.

Microscopisch telbare bacteriën. In Tabel XXVIII B zijn ongeveer 7000 gedoode bacteriën toegevoegd en zijn na de (partiëele) lysis nog 6328 microscopisch telbare bacteriën aanwezig. In Tabel XXIX B zijn ongeveer 9000 gedoode bacteriën toegevoegd en blijven na de lysis nog 8473 bacteriën aantoonbaar (na 390 minuten). In Tabel XXVII B zijn ongeveer 20 000 gedoode bacteriën toegevoegd en blijken na de (partiëele) lysis nog 16 328 bacteriën telbaar te zijn. Ongeveer hetzelfde aantal doode bacteriën, dat toegevoegd is onmiddellijk na de splitsing, blijkt derhalve na de lysis nog aanwezig te zijn. Het aantal doode bacteriën is derhalve niet verminderd: oplossing vindt dus niet plaats.

In Tabel XXVII is in de vloeistof met toevoeging van 5 c.c. bouillon (A) het aantal microscopisch telbare bacteriën in 300 minuten gedaald van ongeveer 17000 tot bijna 0; in de vloeistof met toevoeging van gedoode bacillen (B) ontstond een daling van 37 000 tot 16 000 (de toegevoegde gedoode bacteriën) in 390 minuten. In Tabel XXVIII daalde in de vloeistof zonder toevoeging van bacillen (A) in 210 minuten het aantal microscopisch telbare bacteriën van ongeveer 18 000 tot 2000 en in de vloeistof mèt

toevoeging van gedoode bacteriën (B) in 390 minuten van 25 000 tot 6000 (het aantal toegevoegde gedoode bacteriën). Door de toevoeging van gedoode bacteriën duurt derhalve de daling van het aantal microscopisch telbare bacteriën langer dan in het normale lysisproces, zonder toevoeging van gedoode bacteriën, het geval is.

In Tabel XXVII zijn in de vloeistof, waaraan levende bacillen zijn toegevoegd (C), na 435 minuten weinig microscopisch telbare bacteriën meer aanwezig; in de vloeistof met bouillontoevoeging (A) is dit moment bereikt na 405 minuten en in de vloeistof met toevoeging van gedoode bacteriën (B) na 495 minuten (de toegevoegde gedoode bacteriën niet medegerekend). Toevoeging van levende bacteriën doet derhalve vroeger dan de toevoeging van gedoode bacteriën, maar later dan de toevoeging van sterielen bouillon het aantal microscopisch telbare bacteriën afnemen.

De toegevoegde levende bacteriën (± 17 000 in Tabel XXVII C) waren in 435—105 = 330 minuten gelyseerd, terwijl de van den aanvang af aanwezige levende bacteriën daarvoor 405 minuten (Tabel XXVII A) noodig hadden. Levende bacteriën, welke tijdens het lysisproces (in de eerste periode) toegevoegd worden, worden derhalve sneller gelyseerd dan de van den aanvang af aanwezige bacteriën.

Troebelheid. Door de toevoeging van de gedoode bacteriën worden de vloeistoffen sterker troebel. In Tabel XXVII is zulks vanwege de intensieve troebelheid der oorspronkelijke cultuur niet zoo duidelijk waarneembaar geweest. In Tabel XXVIII is in de vloeistof zonder toevoeging van bacteriën (A) na 300 minuten de troebelheid duidelijk intensiever (abnorme vormen) dan na 210 minuten; na 420 minuten is deze troebelheid weder afgenomen. In de vloeistof mèt toevoeging van gedoode bacteriën (B) wordt de troebelheid na 300 minuten even intensief gevonden als na 210 minuten; na 420 minuten echter is de troebelheid intensiever geworden.

In de vloeistoffen zonder toevoeging van bacillen (Tabellen XXVII A, XXVIII A, XXIX A) komt volkomen helderheid, welke in de vloeistoffen met toevoeging van gedoode bacteriën ont-

breekt; er blijft een troebelheid resteeren, welke afhankelijk is van het aantal toegevoegde gedoode bacteriën.

De lysis komt in de vloeistof zonder toevoeging van bacteriën (A) vroeger tot stand dan in de vloeistof met toevoeging van gedoode bacteriën (B). In Tabel XXVII komt de volledige lysis in A na 405 minuten en de partiëele lysis in B na 495 minuten; in Tabel XXVIII komt de volledige lysis in A na 450 minuten en de partiëele lysis in B na 510 minuten tot stand.

Na toevoeging van levende bacillen komt de lysis (Tabel XXVII C na 435 minuten) later tot stand dan in de vloeistof zonder toevoeging van bacillen (Tabel XXVII A na 405 minuten), maar vroeger dan in de vloeistof met toevoeging van gedoode bacillen (Tabel XXVII B na 495 minuten). De lysis wordt derhalve vertraagd door toevoeging van levende bacillen tijdens het proces; deze vertraging is nog belangrijker, indien gedoode bacteriën midden in het proces toegevoegd worden.

Lysin-titer. In Tabel XXVII werd na 105 minuten titer 3 gevonden in de vloeistof, waaraan steriele bouillon toegevoegd was; in de vloeistof met gedoode bacillen werd na 105 minuten titer 2 aangetroffen. Na 165 minuten was de titer in de vloeistof met bouillontoevoeging 4, in de vloeistof met toevoeging van gedoode bacteriën 3 en in de vloeistof met toevoeging van levende bacteriën 4. Door de toegevoegde gedoode bacteriën wordt dus waarschijnlijk een gedeelte van het bacteriophage lysin geadsorbeerd.

Over de kwestie van het adsorptievermogen van afgestorven, oorspronkelijk lyso-sensibele bacteriën bestaat verschil van meening. Volgens Otto en Munter (61), e.a. wordt lysin door afgestorven bacteriën niet of nauwelijks geadsorbeerd. D. Jaumain (107), da Costa Cruz (108), e.a. meenen integendeel wel een adsorptie van het bacteriophage lysin door afgestorven bacteriën te hebben aangetoond; de bacteriën dienen echter homoloog te zijn, d.w.z. bacteriën, die in levenden toestand door het bacteriophage lysin gelyseerd kunnen worden. Wij hebben door middel van centrifugeerproeven dit vraagstuk nader bestudeerd. Voor het centrifu-

geeren maakten wij gebruik van centrifuge-buisjes, zooals deze door KLEIN zijn aangegeven. Bij het centrifugeeren toch worden dikwijls de watten in de vloeistof gezogen, waardoor het steriel werken in groot gevaar wordt gebracht. Daarom heeft KLEIN centrifuge-buisjes laten vervaardigen, welke op eenige centimeters afstand van het open einde een insnoering bezitten. Het wattenpropje, dat zich boven deze insnoering bevindt, kan nu niet bij het centrifugeeren in de vloeistof terecht komen. In twee van dergelijke gesteriliseerde centrifuge-buisjes (A en B) werden 5 c.c. bacteriophaag lysin (titer 11) gebracht; vervolgens werd bij buisje A 1 c.c. gedoode SHIGA-bacillen en bij buisje B 1 c.c. 0.9 % NaCl-solutie gevoegd. Daarna werden beide buisjes gedurende 1 uur in den thermostaat bij 37° C. geplaatst en vervolgens gedurende $^1/_2$ uur gecentrifugeerd (4800 touren per minuut). Na het centrifugeeren wees de bovenstaande vloeistof titer 6 aan in buisje A en titer 10 inbuisje B.

De proefneming werd herhaald met bacteriophaag lysin van een geringere titer; tevens werd ook een proef met heterologe bacteriën genomen. Bij deze proefnemingen werden dus 3 centrifuge-buisjes (A, B en C) met 5 c.c. bacteriophaag lysin (titer 7) gevuld; bij A werd 1 c.c. gedoode (homologe) SHIGA-bacillen gevoegd, bij B 1 c.c. 0.9 % NaCl-solutie en bij C 1 c.c. gedoode, heterologe bacillen (Bac. faecalis alcaligenes). Deze buisjes werden gedurende 1 uur bij 37° C. gesteld, waarna als boven gedurende $^1/_2$ uur gecentrifugeerd werd. Na het centrifugeeren bleek bij titreeren van de bovenstaande, volkomen heldere vloeistoffen in A titer 4, in B titer 6 en in C eveneens titer 6 aanwezig te zijn.

Uit beide bovenstaande proefnemingen blijkt derhalve, dat de gedoode, homologe bacteriën het bacteriophage lysin adsorbeeren; gedoode heterologe bacteriën doen zulks niet.

Uit de contrôle-proeven (bacteriophaag lysin met 1 c.c. 0.9 % NaCl-solutie) blijkt, dat er weinig of geen titerdaling door het centrifugeeren als zoodanig, zooals wij het in onze proefnemingen uitvoerden, in lysaatbouillon tot stand komt. In de eerste proefneming daalde de titer wel van 11 op 10, maar de verdunning met NaCl-solutie, zoowel als de titratie-techniek, kunnen deze geringe vermindering van de titer voldoende verklaren.

Ouderdom der culturen. In oudere culturen zou, volgens D'HERELLE (6, 71), geen complete, maar wel een partiëele lysis tot stand komen, namelijk van de nog levende bacteriën. Volgens hem worden levende bacteriën, onafhankelijk van den ouderdom der toegevoegde culturen, steeds gelyseerd. Hoe jonger echter de toegevoegde culturen zijn, des te spoediger treedt de lysis op.

In eenige proefnemingen, die bij 22° C. verricht zijn, werd door ons geconstateerd, dat in 100 c.c. bouillon met bacteriophaag lysin en een 15-urige SHIGA-bouilloncultuur de lysis na 18 uren optrad, terwijl in een zelfde hoeveelheid bouillon met een zelfde hoeveelheid bacteriophaag lysin en een zelfde hoeveelheid SHIGA-bacillen, die echter niet 15, maar 7 uren oud waren, de lysis binnen 15 uren tot stand kwam. De lysis trad derhalve met bacillen uit een jongere cultuur, evenals D'HERELLE gevonden heeft, vroeger op dan met die uit een oudere. Bij verschillende begintiters (van de verdunningsreeks volgens APPELMANS) werd hetzelfde resultaat verkregen. In 5-urige SHIGA-bouillonculturen werd bij de begintiters 5 en 3 respectievelijk na 4 en 5 uren lysis geconstateerd, terwijl in 18- en 24-urige SHIGA-bouillonculturen bij dezelfde begintiters resp. na 5 en 6 uren de lysis waargenomen kon worden. Behalve dit verschil in tijd met betrekking tot het optreden van de lysis, welk verschil bij het gebruik van 5-, 6-, 8-, 10-, 18- en 24-urige SHIGA-bouillonculturen overigens niet bijzonder groot was, kon geen onderscheid geconstateerd worden; het proces had bij alle begintiters, zoowel met bv. 5-urige als met 24-urige culturen, een zelfde verloop.

In 48-urige SHIGA-bouillonculturen kwam alleen bij begintiter 9 (de proefnemingen werden verricht met buisjes volgens de verdunningsreeks van APPELMANS : 9 c.c. bouillon + 1 c.c. lysin + $^1/_2$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur) een volkomen helderheid, welke echter veel later optrad dan bv. in 24-urige SHIGA-bouillonculturen; zeer spoedig vertoonde zich ook een secundaire troebelheid. Wij spreken hier opzettelijk niet van volkomen lysis, omdat doode bacteriën, in 48-urige SHIGA-bouillonculturen steeds aanwezig (Tabellen VI en VIII), niet gelyseerd worden; het aantal der toegevoegde, doode SHIGA-bacillen, geëmulsioneerd in 10 c.c. vloeistof, gaf klaar-

blijkelijk nog geen aanleiding tot een waarneembare troebelheid. Bij lagere initiaaltiters kon in 48-urige SHIGA-bouillonculturen in het algemeen geen volkomen helderheid geconstateerd worden. Alleen door toevoeging van een kleinere hoeveelheid bacteriën was alsdan nog volkomen helderheid te verkrijgen. Bij een begintiter 4 bv. werd alleen dàn met 48-urige SHIGA-bouillonculturen volkomen helderheid verkregen, indien $^1/_{10}$ c.c. van een dergelijke cultuur toegevoegd werd, daarentegen niet na toevoeging van 1 c.c. van deze cultuur.

In 72-urige SHIGA-bouillonculturen kwam ook bij hoogere en hoogste initiaaltiters (begintiter 9) geen volkomen helderheid meer; een tijdelijke opheldering kon echter nog wel waargenomen worden.

In oudere (48-, 72-urige, enz.) SHIGA-bouillonculturen is, zooals de Tabellen VI, VII, VIII, IX, X en XI aangeven, reeds een groot aantal bacteriën afgestorven. Deze afgestorven bacteriën, in groote aantallen toegevoegd (van 48-urige culturen grootere hoeveelheden, van oudere culturen reeds kleinere hoeveelheden), zullen de vloeistof troebel doen blijven. Door afgestorven bacteriën wordt bovendien bacteriophaag lysin geadsorbeerd, de lysis vertraagd. De bacteriën in de buisjes met lagere begintiters en 48-urige SHIGA-bouillonculturen en de bacteriën in alle buisjes (ook met hoogere begintiters), waarbij 72-urige SHIGA-bouillonculturen gevoegd waren, vertoonden de morphologische en biologische kenmerken van resistent geworden kiemen.

Concentratie der bacteriën. D'HERELLE (6) geeft aan, dat, hoe meer levende microben toegevoegd worden, des te meer tijd noodig is voor het tot stand komen der lysis. Indien te veel bacteriën toegevoegd worden, is er slechts een partiëele lysis te constateeren, volgens hem (71) aldus te verklaren, dat de werking van den bacteriophaag door stofwisselingsproducten der bacteriën geremd wordt. D'HERELLE acht ± 250 millioen bacteriën per c.c. vloeistof het meest geschikt; bij 500 millioen bacteriën per c.c. vloeistof komt slechts partiëele lysis tot stand. De meening van D'HERELLE, dat stofwisselingsproducten der bacteriën de oorzaak zouden zijn

der partiëele lysis, kan niet juist zijn, aangezien in het filtraat van een bouilloncultuur, waarin door de aanwezigheid van een te groot aantal bacteriën alleen partiëele lysis tot stand gekomen is, opnieuw toegevoegde bacteriën zeer goed groeien en ook complete lysis optreedt, indien een optimale hoeveelheid bacteriën wordt toegevoegd.

SALDANHA (109) is van meening, dat de hoeveelheid toegevoegde bacteriën van invloed is op den duur der periode, gedurende welke de bacteriën zich vermeerderen, maar geen invloed heeft op de intensiteit van vermeerdering der bacteriën.

Eveneens meent OTTO (61), dat de hoeveelheid toegevoegde bacteriën alleen van invloed is op den duur der periode, gedurende welke de bacteriëele vermeerdering optreedt.

SCHUURMAN (23), die eveneens de beteekenis van de concentratie der bacteriën bespreekt, is van meening, dat een bacteriophaag vooral werkt door zijn qualiteit en niet in de eerste plaats door zijn quantiteit. Voegt men aan een sensibele cultuur een kleine hoeveelheid van een zwakken bacteriophaag toe, dan kan er somwijlen toch nog een bijna complete lysis verkregen worden; de bacteriophaag heeft dan onderwijl zijn virulentie verhoogd. Hetgeen SCHUURMAN echter beschouwt als een qualitatieve, moet o.i. veeleer als een quantitatieve verandering — een lysinvermeerdering — opgevat worden, zooals uit onze vroegere proefnemingen — Tabellen I tot VI en XII tot XXII — gebleken is; een lage begintiter gaf tot een belangrijker lysinvermeerdering aanleiding dan een hooge begintiter. In zooverre heeft volgens SCHUURMAN het aantal toegevoegde bacteriën invloed op het lysisproces, dat de secundaire troebelheid afhankelijk is van het aantal, in het bijzonder van het aantal aanwezige resistente variëteiten; in een grooter aantal kiemen neemt de kans op de aanwezigheid van meer resistente kiemen toe.

In een kolf (A) werd gebracht 34 c.c. steriele bouillon en 1 c.c. eener 18-urige SHIGA-bouilloncultuur, in een andere kolf (B) 25 c.c. steriele bouillon en 10 c.c. eener 18-urige SHIGA-bouilloncultuur; zoodat in beide kolven dezelfde hoeveelheid vloeistof aanwezig was, maar een verschillend aantal bacteriën; van beide vloeistoffen

werden het aantal kweekbare en microscopisch telbare bacteriën vastgesteld. Vervolgens werd aan beide kolven 1 c.c. lysin (titer 4) toegevoegd, waarna in beide vloeistoffen wederom het aantal kweekbare en microscopische telbare bacteriën benevens de titer bepaald werden. De kolven werden in den thermostaat bij 37° C. geplaatst. Op verschillende tijdstippen werden in beide kolven de bepalingen van het aantal kweekbare en microscopisch telbare bacteriën en van de titer herhaald.

In kolf A (Tabel XXX) met een geringe concentratie van bacteriën is de lysis reeds opgetreden na 4 uren, in kolf B (Tabel XXXI) met hooge concentratie eerst na $5^1/_2$ uur; de lysin-titer is in de eerste proefneming (A) na 4 uren tot 8, in de laatste (B) na denzelfden tijd slechts tot 4 en eerst na $5^1/_2$ uur tot 8 gestegen.

In een volgende reeks van proefnemingen werden in 5 gesteriliseerde buisjes (A, B, C, D en E) verschillende hoeveelheden van een 18-urige SHIGA-bouilloncultuur gebracht (resp. $^1/_{10}$ c.c., 1 c.c., 2 c.c., 3 c.c., en 4 c.c.); vervolgens werden aan elk buisje een zóódanige hoeveelheid steriele bouillon (resp. $12^9/_{10}$ c.c., 12 c.c., 11 c.c., 10 c.c. en 9 c.c.) en 1 c.c. lysaat (titer 8) toegevoegd, dat in alle buisjes dezelfde hoeveelheid vloeistof (14 c.c.).

TABEL XXX (A).

34 c.c. bouillon + 1 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 4).

Tijd.	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Afsterving.			Troebelheid.	Lysin-titer.
				Aantal afgestorven bacteriën.	Steriliteits-percentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.		
Vóór toevoeging v. h. lysin	3100	3735	4181				+	
Na toevoeging v. h. lysin	2980	3590	3998				+	2
1 uur	3800	4578				22	+	
2 uren	11600	14000	18312	4312	24		+++	3
3 uren	0		10981	10981	100		+++	
4 uren	0						0	8

TABEL XXXI (B).

25 c.c. bouillon + 10 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 4).

Tijd.	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microscteibare bacteriën.	Afsterving. Aantal afgestorven bacteriën.	Afsterving. Steriliteitspercentage.	Afsterving. Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.	Troebelheid.	Lysin-titer.
Vóór toevoeging v. h. lysin	21800	26265	28932				++	
Na toevoeging v. h. lysin	20300	24457	27812				++	2
1 uur	33000					22	+++	
2 uren	54000	65060	86612	21552	25		++++	
3 uren	6000	7470	51018	43548	85		++++	
4 uren	100	120	38218	38098	99		++++	4
5 uren	0	0	27106	27106	100		++	
$5^1/_2$ uur							0	8

aanwezig was. De buisjes werden geplaatst in den thermostaat van 37° C. In de buisjes A, B en C werd na 24 uren een volledige lysis aangetroffen, in buisje C later optredend dan in de buisjes A en B, en bleken de titers in deze buisjes resp. 9, 10 en 9 te bedragen. In de buisjes D en E werd nog wel eenige opheldering, doch geen volledige lysis meer geconstateerd; deze partiëele lysis kwam later dan de complete lysis in de buisjes A, B en C. Bij titratie bleek in buisje E slechts een titer 7 te bestaan. Na 48 tot 60 uren was eerst buisje E en daarna buisje D sterk secundair troebel geworden, korten tijd daarna eveneens buisje C. De buisjes A en B waren na afloop van een week nog volkomen helder.

In 6 gesteriliseerde buisjes (A, B, C, D, E en F) werden verschillende hoeveelheden eener 18-urige SHIGA-bouilloncultuur gebracht (resp. 1, 2, 3, 4, 5 en 6 c.c.); vervolgens werden aan elk buisje een zóódanige hoeveelheid steriele bouillon (resp. 14, 13, 12, 11, 10 en 9 c.c.) en 1 c.c. lysin (titer 11) toegevoegd, dat de totale hoeveelheid vloeistof in alle buisjes dezelfde was (nl.

16 c.c.). Uit de buisjes C en D werd vervolgens 1 c.c. in kolfjes met 25 c.c. sterielen bouillon gebracht (C_1 en D_1), uit de buisjes E en F 1 c.c. in kolfjes met 50 c.c. sterielen bouillon (E_1 en F_1). Buisjes en kolfjes werden bij 37° C. gesteld. Op verschillende tijdstippen werd de troebelheid der culturen nagegaan; van enkele buisjes werd na 6 uren ook de titer bepaald.

TABEL XXXII.

Tijd (uren).	A	B	C	C_1	D	D_1	E	E_1	F	F_1
1	+	+	++	+	++	+	+++	+	+++	+
2	0	0	+	0	++	0	+++	0	+++	0
4	0	0	0	0	0	0	++	0	++	0
6	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0

+: troebelheid
0: volkomen helder.

Na 6 uren gaf de kolf F_1 een titer 6, buisje A eveneens titer 6, doch buisje D vertoonde slechts een titer 4.

Op dezelfde wijze als boven vermeld, werd een reeks van 6 buisjes en 4 kolfjes gereed gemaakt; in plaats van 1 c.c. lysin, titer 11, werd echter 1 c.c. lysin, titer 5, in de buisjes gebracht. De troebelheid der culturen, na plaatsing bij 37° C., werd op verschillende tijdstippen nagegaan (zie Tabel XXXIII op pag. 84).

Opmerkelijk was in deze proefneming, dat zeer spoedig secundaire troebelheid optrad in de vloeistoffen, waaraan zeer vele bacteriën waren toegevoegd, nl. in de buisjes C, D, E en F; de buisjes A en B en de kolven C_1, D_1, E_1, F_1 bleken nog na eenige weken helder te zijn.

Bij de proefneming van Tabel XXXIII (lage begintiter) werd in alle buisjes en kolfjes eerst een toeneming van troebelheid geconstateerd; bij de proefneming van Tabel XXXII (hooge begintiter) werd zulks niet waargenomen.

Uit deze 4 reeksen van proefnemingen blijkt:

1°. dat bij hoogere concentraties der bacteriën de lysis later

TABEL XXXIII.

Tijd (uren).	A	B	C	C_1	D	D_1	E	E_1	F	F_1
1/2	+	+	++	+	++	+	++	+	++	+
2	++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
8	+++	+++	+++	0	+++	0	+++	0	+++	0
24	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0

+: troebelheid.
0: volkomen helder.

tot stand komt en bij zeer hooge concentraties niet meer compleet, doch slechts partiëel is;

2⁰. dat op gelijke tijdstippen na het begin van het proces bij hoogere concentraties der bacteriën de titer lager wordt bevonden dan bij geringere concentraties; en

3⁰. dat een secundaire cultuur van resistente bacteriën vroeger optreedt, naarmate de concentratie van de vloeistof aan bacteriën grooter is.

Er is derhalve een bepaalde maximale concentratie van bacteriën, waarbij het lysisproces nog optimaal tot stand komt.

HOOFDSTUK III.

Invloed van de samenstelling van het vloeibaar milieu op de bacteriophage lysis.

J. Bablet (110) heeft het eerst aangetoond, dat de werkzaamheid van het lysin verdwijnt, indien met het bacteriophage lysin passages in sterielen bouillon worden verricht.

W. C. Davison (65), die in plaats van bouillon 1 % peptonwater gebruikte, vond eveneens een inactief worden van het lysin, indien dit telkens in 1 % steriel peptonwater overgebracht werd.

d'Herelle is van meening, dat lysis van bacteriën mogelijk is in zuiver water, mits de P_H-waarde met NaOH op 8 wordt gebracht, de bacteriën er gedurende 24 uren levend in blijven en een zeer virulente bacteriophaag wordt gebruikt.

Kabelick (111) zegt, dat in physiologische NaCl-oplossing, waarin bacteriën zich niet vermeerderen, lysis kan optreden.

W. C. Davison (65) meent eveneens in een 0.8 % NaCl-oplossing bij een $P_H = 8$ lysis geconstateerd te hebben.

Ook Schuurman zegt, dat bacteriën, welke zich onder invloed van antiseptica niet meer vermeerderen, grootendeels opgelost kunnen worden; passages zijn echter in zulk een milieu niet meer mogelijk, omdat de virulentie van de bacteriophagen daarvoor te snel daalt.

d'Herelle vond in 35 % glycerine een ophouden van bacteriëngroei, terwijl bij een concentratie van 60 % toch nog wel lysis kon worden waargenomen.

Otto en Munter (61) herhaalden de proefnemingen van Kabelick en Davison, doch konden in geen geval lysis constateeren.

Ook de meeste andere onderzoekers zijn van oordeel, dat in media, waarin alle voedingsstoffen ontbreken of een vermeerdering van bacteriën niet meer kan optreden, geen lysis tot stand kan komen.

Wij hebben met Shiga-bacillen en Shiga-lysin eveneens nagegaan, of de bacillen, in een 0.9 % NaCl-oplossing gesuspendeerd, gelyseerd kunnen worden; evenals door d'Herelle en W. Davison werd ook door ons physiologische NaCl-oplossing gebruikt met $P_H = 8$. De Shiga-bacillen, die voor deze proefnemingen gebruikt werden, waren afkomstig van scheefagarculturen, die gedurende 16 uren bij 37° C. gecultiveerd waren.

Bij deze proefnemingen diende er natuurlijk speciaal op gelet te worden, dat met het lysin zoo weinig mogelijk voedingsstoffen uit den lysaatbouillon in de NaCl-oplossing werden overgevoerd; het lysin toch wordt als lysaatbouillon toegevoegd en in dezen bouillon zijn uit den aard der zaak nog steeds voedingsstoffen aanwezig.

In 10 c.c. eener steriele 0.9 % NaCl-oplossing werden Shiga-bacillen van een 16-urige agarcultuur gebracht; het aantal dezer bacteriën werd bepaald volgens de kweekmethode en de microscopische tel-methode. Daarna werd deze keukenzoutemulsie verdeeld in 2 gelijke deelen; bij de eene helft (Tabel XXXIV) werd 1 c.c. lysaat met titer 9 gevoegd en bij de andere helft (Tabel XXXV) 1 c.c. lysaat met titer 4. De buisjes werden vervolgens bij 37° C. gesteld.

Uit deze proefneming blijkt, dat onder de aangegeven verhoudingen de Shiga-bacillen nog in staat zijn zich te vermeerderen; immers in Tabel XXXV is het beginaantal kweekbare bacteriën van 11500 gestegen tot 39000 (na 5 uren). Met den toegevoegden lysaatbouillon (6-voudig met de NaCl-oplossing verdund) werd derhalve ongetwijfeld nog een voldoende hoeveelheid voedingsstoffen in de physiologische NaCl-oplossing overgebracht, om bij een lagere begintiter nog bacteriënvermeerdering mogelijk te maken.

TABEL XXXIV.

5 c.c. NaCl-oplossing + SHIGA-bacillen + 1 c.c. lysin (titer 9).

Tijd.	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Troebelheid.	Lysin-titer.
Vóór de toevoeging v. h. lysin	11500	13000	++++	
Na de toevoeging v. h. lysin	7500	12600	++++	8
Na 5 uren	3000		++	7
Na 24 uren			+	

TABEL XXXV.

5 c.c. NaCl-oplossing + SHIGA-bacillen + 1 c.c. lysin (titer 4).

Tijd.	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Troebelheid.	Lysin-titer.
Vóór de toevoeging v. h. lysin	11500	13000	++++	
Na de toevoeging v. h. lysin	10500	12500		3
Na 5 uren	39000		+++++++	
Na 24 uren			+	

Een tweede proefneming werd als volgt ingericht. In 9 c.c. eener steriele 0.9 % NaCl-oplossing werden SHIGA-bacillen van een 16-urige agarcultuur geëmulsioneerd; daarna had toevoeging plaats van 1 c.c. lysaatbouillon (titer 9), zoodat derhalve een 10-voudige verdunning met de NaCl-oplossing tot stand kwam. Vóór de toevoeging van het lysin waren in de emulsie per lus 46000 kweekbare bacteriën aanwezig; onmiddellijk na de toevoeging van het lysaat bedroeg dit aantal slechts 4800. Het buisje werd vervolgens in den thermostaat bij 37° C. geplaatst. Na 24 uren waren er per lus nog 500 kweekbare bacteriën voorhanden; deze bacteriën bleken resistent te zijn geworden (op agar-platen overgeënt, gaven zij aanleiding tot het ontstaan der z.g. „Flatterformen"); de titer bleek tot 7 gedaald. Ter vergelijking was

een contrôle-proef genomen met 0.9 % NaCl-oplossing en SHIGA-bacillen in dezelfde concentratie, echter zonder dat hierbij lysin gevoegd was; na 24 uren bleken hierin slechts 4 kweekbare bacteriën per lus aanwezig te zijn. De keukenzoutoplossing, waaraan lysaat was toegevoegd, was na 24 uren veel helderder geworden dan de contrôle, zoodat dus een partiëele lysis tot stand gekomen was. Uit de waarneming, dat in NaCl-oplossing met lysin na 24 uren nog 500 kweekbare bacteriën per lus aanwezig waren en in de contrôle-vloeistof zonder lysin slechts 4, kan afgeleid worden, dat er ook bij een 10-voudige verdunning van het lysaat toch nog voedingsstoffen in de NaCl-oplossing waren overgebracht.

Het was derhalve nu noodzakelijk geworden na te gaan, hoever onze voedingsbouillon met 0.9 % NaCl-oplossing verdund diende te worden, om geen vermeerdering van bacteriën meer tot stand te doen komen. Bij 9 c.c. eener SHIGA-bacillenemulsie in steriele 0.9 % NaCl-solutie werd 1 c.c. van een 100-voudig met steriele 0.9 % NaCl-solutie verdunde bouillon gevoegd, zoodat de bouillon in het geheel 1000-voudig verdund werd.

TABEL XXXVI.

9 c.c. NaCl-oplossing + SHIGA-bacillen + 1 c.c. 100-voudig met NaCl-sol. verdunde bouillon.

Tijd (uren).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.
0	7600	8086
5	7200	7031
30	220	7734

Uit deze tabel blijkt dus, dat in 1000-voudig met NaCl-solutie verdunden bouillon geen vermeerdering van bacteriën meer plaats vindt.

Thans kon tot de proefneming met lysaatbouillon worden overgegaan, welke eveneens 1000-voudig met steriele 0.9 % NaCl-oplossing werd verdund. In 9 c.c. steriele 0.9 % NaCl-oplossing werden SHIGA-bacillen eener 16-urige agarcultuur

geëmulsioneerd en vervolgens werd 1 c.c. 100-voudig met steriele 0.9 % NaCl-solutie verdunde lysaatbouillon toegevoegd (Tabellen XXXVII en XXXVIII); bij de proefneming, aangegeven in Tabel XXXVIII werd tevens een contrôle-proef (Tabel XXXIX) genomen met steriele 0.9 % NaCl-oplossing, waarbij SHIGA-bacillen en 1 c.c. 100-voudig met steriele 0.9 % NaCl-solutie verdunde bouillon gevoegd werden. De buisjes werden in den thermostaat bij 37° C. geplaatst.

Bij geen enkele dezer proefnemingen is vermeerdering van bacteriën waar te nemen. Lysis blijft achterwege. Microscopisch zijn geen abnorme vormen te zien, terwijl ook op de platen geen „Flatterformen" geconstateerd kunnen worden. De titer is gedaald in Tabel XXXVII van 6 op 4 en in Tabel XXXVIII van 6 op 3.

TABEL XXXVII.

9 c.c. NaCl.-oplossing + SHIGA-bacillen + 1 c.c. 100-voudig met NaCl-sol. verdunde lysaatbouillon.

Tijd.	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Lysin-titer.
Vóór de toevoeging v. h. lysin	3920		
Na de toevoeging v. h. lysin	4900	5449	6
Na 5 uren	5000	5625	4

TABEL XXXVIII.

9 c.c. NaCl-oplossing + SHIGA-bacillen + 1 c.c. 100-voudig met NaCl-sol. verdunde lysaatbouillon.

Tijd.	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Lysin-titer.
Vóór de toevoeging v. h. lysin	40000	45000	
Na de toevoeging v. h. lysin	39800	43261	6
Na 5 uren	35210	42890	4
Na 24 uren	398	37211	3

TABEL XXXIX.

9 c.c. NaCl-oplossing + SHIGA-bacillen + 1 c.c. 100-voudig met NaCl-sol. verdunde bouillon.

Tijd.	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.
Vóór de toevoeging v. h. lysin	40000	45000
Na 5 uren	35948	43593
Na 24 uren	470	38672

In een 0.9 % NaCl-oplossing zonder voldoende voedingsstoffen kan derhalve het bacteriophage lysin niet op de bacteriën inwerken. Waarschijnlijk zijn in de proefnemingen van D'HERELLE en anderen, die nog partiëele lysis konden zien optreden, voedingsstoffen met den lysaatbouillon in de keukenzoutoplossing overgebracht.

TETSUJI OKAMOTO (112) meende aangetoond te hebben, dat het ontstaan van het lysin gebonden is aan de aanwezigheid van polypeptiden in den bouillon; hij nam aan, dat de vorming van het bacteriophage lysin een functie is van de bacteriëele (eiwit-) stofwisseling, zooals ook reeds zijn leermeester SEIFFERT heeft uiteengezet: op een eiwitvrijen voedingsbodem vond OKAMOTO, ook bij een sterke bacteriënvermeerdering, geen toeneming van het lysin.

Eveneens konden MAITLAND (113) en E. LEPPER (114) op een eiwitvrijen voedingsbodem slechts een minimale lysinvermeerdering constateeren.

D'HERELLE daarentegen had reeds medegedeeld, dat ook op eiwitvrije voedingsbodems een sterke vermeerdering van bacteriophagen optreedt, doch volgens SEIFFERT en OKAMOTO heeft D'HERELLE vermoedelijk met het overbrengen van den bacteriophaag ook veel eiwit overgevoerd.

Volgens verschillende onderzoekers bezit bouillon een beschuttenden invloed op het bacteriophage lysin. YASAKI (116) vond, dat in lysaatbouillon het lysin niet gemakkelijk geadsorbeerd (filtratie, kaoline) en evenmin gemakkelijk vernietigd wordt

(b.v. door verhoogde temperaturen). Wordt de lysaatbouillon sterk met water verdund, dan is het lysin integendeel zeer gemakkelijk adsorbeerbaar en vernietigbaar, hetgeen ook geschiedt, indien de lysaatbouillon met NaCl-solutie of een tryptophaanvoedingsbodem volgens BRAUN verdund wordt. Daarentegen blijkt er weinig verschil te bestaan tusschen de verdunning met bouillon en de verdunning met peptonwater of vleeschwater. Uit zijn proefnemingen leidde YASAKI af, dat het pepton in den bouillon niet alleen als voedingsstof dienst doet, maar ook een beschuttenden invloed tegenover het bacteriophage lysin uitoefent. Deze beschuttende invloed is volgens hem toe te schrijven aan de oppervlaktespanning-verlagende werking van pepton.

C. ZOELLER (117) constateerde, dat het lysin in NaCl-oplossing door bestraling in 10 minuten vernietigd werd; in bouillon bleek het weerstandsvermogen veel grooter te zijn.

DOERR kon deze beschermende werking afleiden uit een verhoogde thermo-resistentie van het lysin in bouillon, J. BRONFENBRENNER en CH. KORB (119) uit een verhoogde resistentie van het lysin in bouillon tegen de inwerking van alcohol.

ZDANSKY (120) stelde voor de beschermende werking van bouillon bivalente kationen verantwoordelijk; er zou om het lysin een omhullend ionenlaagje gevormd worden.

Door een aantal onderzoekers is de beteekenis van de reactie van den voedingsbodem onderzocht. D'HERELLE zegt in zijn boek, dat in zure omgeving geen lysis tot stand komt.

GRATIA geeft aan, dat door een geringere H-ionenconcentratie de lysis bevorderd wordt. In neutralen bouillon ($P_H = 7.0$) komt de lysis minder goed tot stand; een zuur milieu (bv. $P_H = 6.8$) remt de lysis nog meer, terwijl een alcalisch milieu ($P_H = 8$ tot 8.5) optimaal is voor het lysisproces.

Ook W. DAVISON (66) wijst op de beteekenis der P_H-waarde.

ELIAVA en POZERSKI deelen mede, dat het lysin werkt van $P_H = 2.5$ tot $P_H = 8.4$.

OTTO, MUNTER en WINKLER (61) kunnen echter het door hen onderzochte coli-lysin alleen verkrijgen in een milieu van $P_H = 6.5$.

E. SCHIEDEGGER (21), een medewerker van DOERR, ging den invloed van de H-ionenconcentratie op de lysis meer systematisch na. Hij komt o.a. tot de volgende conclusies:

1⁰. Lysin en bacterie co-existeeren naast elkander bij een H-ionenconcentratie van $P_H = 4.5$, schijnbaar zonder elkander te beïnvloeden (titer 7, bij 37° C.); de componenten voor de lysis (lysin en bacterie) zijn voldoende aanwezig, doch de lytische reactie (lysinvermeerdering en lysis) vindt niet plaats. Indien nu de bacteriën uit het zure lysin-houdende milieu in een alcalisch medium overgeënt worden, dan treedt lysin-productie en lysis op; de bacteriën worden derhalve niet lyso-resistent.

2⁰. Een H-ionenconcentratie van $P_H = 4.5$ laedeert het lysin niet; zelfs niet bij een inwerking gedurende meerdere uren bij 20°— 37° C. Bij een H-ionenconcentratie van $P_H = 4.5$ wordt het lysin bij 56° C. in 2 uren bijna volkomen vernietigd, hetgeen bij een zwak-alcalische reactie niet het geval is.

3⁰. Het te voorschijn roepen van een neutrale of alcalische reactie brengt het lysisproces, dat in den zuren, lysin-houdenden bouillon geremd was, onmiddellijk weder in gang; er was hier derhalve een inactiveering, doch geen vernietiging van één of beide componenten opgetreden.

J. DA COSTA CRUZ (122) verklaart deze laatste werking aldus, dat het lysin (evenals de globulinen) in zure omgeving neerslaat, waardoor de lytische reactie onderbroken wordt. Indien de aciditeit niet te sterk is geweest, dan is deze reactie reversibel, zoodat door het te voorschijn roepen van een alcalische reactie het bacteriophage lysin weder in oplossing gaat en het lysisproces weder voortschrijdt.

SCHUURMAN (23) heeft ook den invoed van de P_H-waarde nader onderzocht. Het bleek hem, dat de lysis het snelst en meest compleet verloopt bij een P_H-waarde van 8.2. Hoe lager de P_H-waarde, des te vroeger komen er secundaire culturen; deze blijven bij $P_H = 8.2$ geheel uit. SCHUURMAN vond, dat een dysenterie-FLEXNER-stam bij 37° C. goed werd opgelost door het homologe lysin bij $P_H = 8.2$ tot $P_H = 7.2$. Wilde hij de lysis nu in zure omgeving ($P_H < 7.0$) nog compleet zien optreden, dan diende hij

het proces bij 25° C. te doen verloopen; alsdan was nog lysis mogelijk tot $P_H = 6.7$. De H-ionen zouden volgens hem de vermenigvuldigingssnelheid van den bacteriophaag verminderen; daarom moet die der bacteriën door de temperatuur eveneens verlaagd worden.

J. DA COSTA CRUZ (108, 123, 124, 125) heeft op de beteekenis van de electrolyten in den bouillon het eerst de aandacht gevestigd. In neutraal reageerend peptonwater, waarin de dysenterie-FLEXNER-bacil goed groeide, werd deze bacil door het homologe lysin niet beïnvloed; na toevoeging echter van 0.5 % NaCl-oplossing, $CaCl_2$ of $MgSO_4$ zag hij wel lysis optreden. „Niet slechts het deelingsstadium der bacteriën is onontbeerlijk, maar bovendien moeten er voor het lytisch proces electrolyten aanwezig zijn." In aq. dest. zou het lysin, dat hij (124) als een antilichaam opvat, uitvlokken, terwijl door electrolyten de dispersiteitsgraad van het lysin zou worden verhoogd.

SCHUURMAN daarentegen meent op grond van zijn proefnemingen het uitvlokken van het lysin in aq. dest. te moeten ontkennen.

LISBONNE en CARRÈRE (126) concludeeren uit hun proefnemingen, dat bij afwezigheid van electrolyten de binding van het lysin aan de bacterie achterwege blijft.

Volgens P. BRUTSAERT (128, 129) is echter de aanwezigheid van electrolyten niet onmisbaar voor alle lysinen; sommige lysinen kunnen bij afwezigheid van electrolyten niet werken, doch andere wel. Niet alleen bouillon met minder electrolyten („hyposalé") of zonder electrolyten („asalé") werd door hem (58) onderzocht, doch ook bouillon met grootere hoeveelheid electrolyten (bouillon „hypersalé"). In bouillon „hypersalé" werden de bacteriën (staphylococcen) zelfs veel gevoeliger voor de inwerking van het bacteriophage lysin.

AHESHOV (130) vond, evenals door BRUTSAERT werd geconstateerd, dat 0.5 % NaCl-oplossing bevorderend werkt op de lysis.

CIUCA (131) acht de rol van de electrolyten minder belangrijk.

D'HERELLE geeft aan, dat chloorcalcium de lysis belet, kaliumchloraat de lysis vertraagt, doch magnesiumsulfaat en K-, Na-phosphaat juist bevorderend op de lysis werken.

Volgens W. Borchardt (132), R. Doerr (18), A. Seiser (133) en Y. Aheshov (130) zouden de bacteriën bij de aanwezigheid van glucose beter gelyseerd worden.

Door toevoeging van colloiden, o.a. van gelatine en agar-agar, wordt het proces in ongunstigen zin beïnvloed; het lysisproces kan daarin dikwijls niet voltooid worden. Juist door deze „antilytische" werking is men immers in staat het aantal levende bacteriën door middel van gelatine- en agarplaten vast te stellen. d'Herelle is van meening, dat wij hier te doen hebben met een directe werking op het lysin.

Doerr en Berger (20) hebben dit vraagstuk uitvoeriger onderzocht. Hun conclusies zijn:

1⁰. Gelatine, agar-agar, in het algemeen colloiden, remmen de lytische reactie; gelatine remt zoowel in vloeibaren als in vasten toestand.

2⁰. De gelatineremming neemt toe met de concentratie en treedt op zoowel bij 15° C. als bij 37° C., is derhalve onafhankelijk van de temperatuur.

Zij zijn van meening, dat van een neutraliseeren van het lysin door of adsorbeeren aan gelatine geen sprake kan zijn, aangezien uit een mengsel van gelatine en lysin, ook zelfs na een langdurig contact, het bacteriophage lysin quantitatief terug te krijgen is en zelfs ook bij hoogere gelatineconcentraties de inwerking van het lysin nooit geheel achterwege blijft. Wel wordt de terminale acte, de lysis, belet, maar steeds worden de bacteriën resistent, waaruit geconcludeerd kan worden, dat het lysin nog wel degelijk invloed uitoefent. Verder komt volgens hen de productie van het lysin op de gewone wijze tot stand, evenals ook de afsterving der bacteriën (het aantal kweekbare bacteriën wordt kleiner). Deze onderzoekers putten daaruit een argument tegen de opvatting, dat het bacteriophage lysin zou vrijkomen bij de oplossing der bacteriën. De verklaring van den invloed van gelatine op het lysisproces is volgens Doerr en Berger de volgende. Het lysin verwekt bij de bacterie een abnormale stofwisseling; secundair treedt als physisch gevolg hiervan een verandering aan de opper-

vlakte der bacterie-cel op en wel een membraanlaesie. De werking van gelatine zou nu volgens hen hierop neerkomen, dat op de buitenzijde van het membraan een colloidaal tegenwicht door gelatine ontstaat en aldus het uittreden der stoffen uit den inhoud der cel wordt belet (uitblijven der lysis), derhalve een soort „Schutz-colloid"-werking. Experimenteele bewijzen voor deze opvatting konden zij echter niet aanvoeren. Deze membraanlaesie zou volgens hen ook kunnen verklaren het prae-lytisch optreden van een agglutinatie der bacteriën. SCHUURMAN schrijft deze prae-lytische agglutinatie echter toe aan de aanwezigheid van verschillende typen in de cultuur; herhaaldelijk vond hij in een en dezelfde cultuur varianten, die onafhankelijk van elke lytische inwerking reeds agglutinatie vertoonden.

OTTO en MUNTER (61, 134) sluiten zich bij de opvatting van DOERR en BERGER aan.

Volgens O. NAKAMURA (135) verhindert de gelatine niet alleen de lysis, maar werkt ook remmend op de productie van het bacteriophage lysin; althans bleek hem dit bij zijn SHIGA-bacil en SHIGA-lysin. Vooral wordt de productie in den eersten tijd geremd; na enkele uren krijgt men gewone toeneming. Niet alleen gelatine en agar-agar, maar ook gummi arab., tragacanth en salebwortelpoeder werken op dezelfde wijze. Men heeft dus te doen met een algemeene werking van colloidale stoffen.

Volgens P. BRUTSAERT (136, 137) zou bij hooge gelatineconcentraties (10 à 12 %) door de bacteriëele stofwisseling een daling van de P_H tot stand komen, waardoor voornamelijk de lysis geremd wordt.

P. HAUDUROY (138) schrijft de remmende werking toe aan de groote viscositeit dezer stoffen, want:

1. Niet alleen gelatine en agar-agar, maar ook gom, eiwit, enz. werken remmend; al deze colloiden bezitten een groote viscositeit.

2. Hoe hooger concentratie, des te sterker remming treedt er op.

3. Het bacteriophage lysin wordt niet vernietigd; door de groote viscositeit te verminderen krijgt men weer lysis en dit gelukt zelfs nog, indien het contact tusschen SHIGA-bacillen, lysin

en gelatine 3 tot 4 dagen heeft geduurd. Volgens dezen onderzoeker ontstaan er nooit resistente vormen, waaruit hij afleidt, dat het lysin niet met de bacteriën in aanraking kan komen. HAUDUROY deed zijn proefnemingen met SHIGA-bacillen, DOERR en BERGER met colibacillen.

J. DE NECKER (139) vond reeds, dat colloiden het lysin adsorbeeren, hetgeen na hem door verschillende andere onderzoekers werd bevestigd.

JOETTEN (105) is van meening, dat een diffusie van het bacteriophage lysin mogelijk is door 3 % agar-agar, hetgeen echter door FLU (140) wordt bestreden.

SCHUURMAN heeft aangetoond, dat een dergelijke diffusie wel plaats vindt in 1 % agar-agar, hetgeen overeenkomt met de mededeeling van BAIL, dat verdunde agar meer geschikt is voor lytische werking. SCHUURMAN verwerpt de „Schutzcolloid"-theorie, aangezien de „Schutzcolloid"-werking juist bij geringere concentraties van het emulsoid voor den dag zou moeten treden, terwijl toch bij hooge concentraties de remming het sterkst is. Hij is van meening, dat alles er op wijst, dat de remming der lysis verklaard moet worden door verhoogde viscositeit en adsorptie.

Door ons werd eveneens de invloed van de gelatine nagegaan. Wij gebruikten gesmolten 10 of 20 % voedingsgelatine met een $P_H = 7.2$.

Vooreerst werd de titer van ons lysaat volgens de verdunningsmethode van APPELMANS (bij 37° C.) bepaald, zoowel in bouillon als in vloeibare 10 % gelatine. Volgens de reeks met bouillonbuisjes bleek het lysaat een titer 10 te bezitten; in de reeks met gelatinebuisjes werd slechts titer 6 geconstateerd, d.w.z. waren de eerste 6 gelatinebuisjes volkomen helder geworden (na te voren een periode van toegenomen troebelheid vertoond te hebben in de buisjes 4, 5 en 6). Opmerkelijk was, dat de lysis in de gelatinebuisjes veel later optrad dan in de bouillonbuisjes; de lysis werd derhalve vertraagd.

Een zelfde titerbepaling in een vloeibare 20 % voedingsgelatine gaf slechts een titer 1.

Een tweede proef werd als volgt ingericht. Aan 3 buisjes (A, B en C) met 9 c.c. gesmolten 10 % voedingsgelatine werd lysaat in zóódanige hoeveelheden toegevoegd, dat de begintiter in A 7, in B 2 en in C 0—1 bedroeg. De buisjes werden met 18-urige SHIGA-bouilloncultuur geënt en daarna in den thermostaat bij 37° C. geplaatst. Bij deze 3 buisjes werd tevens een contrôle (gelatine met 18-urige SHIGA-bouilloncultuur zonder lysin) geplaatst. Na 24 uren werd in A en B lysis geconstateerd; buisje C was intensief troebel. Bij titratie bleek A thans titer 9 te bezitten en B titer 4. Buisje B vertoonde zeer spoedig een secundaire troebelheid; na 48 uren was ook A secundair troebel geworden. De secundaire culturen, welke zeer vlokkig waren, werden door resistente bacteriën veroorzaakt. Ook de bouillonbuisjes van de verdunningsreeks volgens APPELMANS bij de titratie van het gelatinehoudende milieu werden spoedig secundair troebel. Opgemerkt werd ook hier, dat bij het overbrengen van een lus uit deze secundair troebele vloeistoffen in agarplaten het aantal koloniën veel geringer werd dan er in de lus bacteriën aanwezig waren.

Een derde proefneming geschiedde op de volgende wijze. Gereed gemaakt werden 4 buisjes (A, B, C en D). In A werd 9 c.c. vloeibare 10 % voedingsgelatine samengevoegd met 1 c.c. lysin (titer 9) en een zoo groote hoeveelheid van een 16-urige SHIGA-agarcultuur, dat de emulsie intensief troebel was. In B (contrôle) werd door samenvoeging van 10 c.c. gesmolten 10 % voedingsgelatine en SHIGA-agarcultuur een zelfde troebelheid bereikt. In C werd bij 9 c.c. gesmolten 10 % voedingsgelatine 1 c.c. lysin (titer 8) gevoegd en zooveel SHIGA-agarcultuur, dat de emulsie even troebel was. Buisje D met 10 c.c. gesmolten 10 % voedingsgelatine en SHIGA-agarcultuur diende eveneens als contrôle. De buisjes werden in den thermostaat bij 37° C. geplaatst. Na 6 uren was C volkomen helder en A sterk in troebelheid afgenomen; na 8 uren werd ook A bijna volkomen helder. Na 24 uren waren beide buisjes weder secundair troebel geworden (resistente kiemen).

Een laatste proefneming werd verricht met een kolfje, waarin 25 c.c. vloeibare 10 % voedingsgelatine samengevoegd werd

met $1^1/_2$ c.c. 18-urige SHIGA-bouilloncultuur en $2^1/_2$ c.c. lysin (titer 5). Onmiddellijk na de toevoeging en op verschillende tijdstippen daarna werd het aantal kweekbare en microscopisch telbare bacteriën vastgesteld en tevens de lysin-titer bepaald; gedurende de proefneming werd de kolf in den thermostaat bij 37° C. gesteld.

TABEL XXXX.

25 c.c. vloeibare v. gelatine (10 %) + $1^1/_2$ c.c. SHIGA-bouillon-cultuur + $2^1/_2$ c.c. lysin (titer 5).

Tijd (uren).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.		Afsterving.			Troebelheid.	Lysin-titer.
			totaal	abnorm.	Aantal afgestorven bacteriën.	Steriliteits-percentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.		
0	3600	4337	4515					+	4
2	4800	5783	10898	5092	5115	46	} 31	++	
3	0	—	17578	15071	17578	100	} 100	+++	
4	0	—	—					0	8

Uit deze proefnemingen met vloeibare voedingsgelatine bij 37° C. blijkt derhalve, dat vloeibare voedingsgelatine van 10 % remmend werkt bij lagere titers, 20 % gelatine ook bij hoogere titers; de verhoogde concentratie der vloeibare voedingsgelatine versterkt dus zeer intensief de remming. Bij hoogere titers konden wij, in tegenstelling met alle andere onderzoekers, volledige lysis constateeren; tevens stemden lysinproductie en verloop van het lysisproces geheel overeen met het lysisproces in bouillon (Tabel XXXX). Opmerkelijk is het constante en snelle optreden van secundaire culturen, alsmede de vertraging der lysis.

HOOFDSTUK IV.

Invloed van de zuurstof, filtratie en temperatuur op de bacteriophage lysis in vloeibaar milieu.

Zuurstof. Vrij algemeen wordt aangenomen, dat de lysis plaats vindt zoowel bij O_2-aanwezigheid als bij O_2-afsluiting (D'HERELLE 6, IZAR 57, JAUMAIN 147, W. DAVISON 65, GILDEMEISTER en HERZBERG 148, H. v. PREISZ 43). Volgens IZAR zou O_2-afsluiting zelfs een gunstigen invloed hebben, met name het optreden van secundaire culturen tegengaan.

A. LODE (145), werkend met een bacteriophaag lysin tegenover bac. pyocyaneus, vond bij O_2-afsluiting een toeneming van het bacteriophage lysin, hetgeen echter door MC. LEOD en GOVENLOCK (146) ontkend wordt.

Bij onze proefnemingen met het bacteriophage lysin tegenover SHIGA-bacillen konden wij constateeren, dat bij O_2-afwezigheid wel lysis optreedt, maar dat overigens onder dezelfde verhoudingen voor het tot stand komen der lysis bij O_2-afwezigheid meer tijd noodig is dan bij O_2-aanwezigheid; een toeneming van het bacteriophage lysin tot de maximale titer kon eveneens waargenomen worden.

* * *

Filtratie. D'HERELLE (6) vond reeds, dat filtratie op het aantal bacteriophagen geen invloed heeft; hij filtreerde door CHAMBERLAND-PASTEUR-kaarsen L_2 en L_3.

LEDINGHAM (149), OTTO en zijn medewerkers (150) waren integendeel van meening, dat na filtratie de lysaatbouillon een hoogere titer aanwijst. OTTO (165), die het bacteriophage lysin be-

schouwt als een aan zeer kleine bacteriënelementen gebonden fermentatief agens, meende dit zoo te kunnen verklaren, dat grovere partikeltjes, die vóór het filtreeren op het bacteriophage lysin remmend inwerken, in de filterkaars worden teruggehouden.

PRAUSNITZ (44) filtreerde herhaaldelijk door een en dezelfde kaars zonder voorafgaande reinigingen der kaars, bepaalde de werkzaamheid van de vloeistof na elke filtratie en vond toen, dat het 7e filtraat $^2/_3$, het 11e filtraat nog slechts $^1/_5$ van de oorspronkelijke lysinhoeveelheid bevatte. Hij verklaarde deze vermindering uit de verstopping der kaars, waardoor bacteriophaag lysin wordt teruggehouden.

YASAKI (116) constateerde, dat in het algemeen bij het filtreeren door een ongebruikt BERKEFELD-filter lysaatbouillon (met name onverdunde lysaatbouillon) onveranderd in titer bleef. Indien hij den lysaatbouillon echter sterk verdunde met water of 0.9 % NaCl-oplossing en dit verdunde lysaat door een ongebruikte BERKEFELD-kaars filtreerde, dan was er steeds in het filtraat een lagere titer aanwezig. Deze titerdaling schreef YASAKI toe aan een adsorptiewerking; door bouillon zou deze adsorptie belet worden. De adsorptie-belettende werking van bouillon zou volgens hem voor een deel verklaard moeten worden uit veranderingen in oppervlaktespanning. Het in bouillon aanwezige pepton is een capillair-actieve stof en heeft een oppervlaktespanning-verlagenden invloed (BRINKMAN en VON SZENT-GYÖRGYI 151); het druppelaantal van voedingsbouillon (130) is grooter dan dat van aq. dest. (100), gemeten met de druppelpipet van MICHAELIS. Bij het filtreeren zal, zoo meende YASAKI, het bacteriophage lysin door de oppervlaktespanning-verlagende stoffen van den bouillon voor adsorptie beschermd worden. Naast oppervlaktespanning-verlagende stoffen zijn volgens YASAKI wellicht ook nog andere stoffen aanwezig, die bij filtratie een daling van de lysin-titer beletten; hij dacht o.a. aan een „Schutzcolloid"-werking van in bouillon voorhanden hydrophiele colloiden. YASAKI ontraadt veel te filtreeren. Alleen indien bacteriënvrij, helder lysaat noodig is, filtreert hij en wel door ongebruikte kaarsen.

Ook GILDEMEISTER en HERZBERG (148) gingen den invloed van

filtratie na; zij vonden door filtreeren een titerdaling. Zij schreven deze daling vooreerst toe aan het mechanisch moment van verstopping der kaars (hoe vaker de kaars gebruikt is, des te grooter invloed heeft deze factor) en vervolgens aan adsorptiewerking. Evenwel ook het bacteriophage lysin zelf is van beteekenis: een dysenterie Y-lysin gaf na filtratie door een BERKEFELD-kaars minder verlies dan een coli-lysin. Tenslotte was er in mindere of meerdere mate ook verschil waar te nemen tusschen de eene en de andere kaars.

Wij vonden, evenals D'HERELLE, dat in het algemeen het filtreeren van lysaatbouillon, met name door nieuwe kaarsen, geen invloed uitoefent op het bacteriophage lysin. Een bevorderende invloed kon in geen enkel geval geconstateerd worden. Alleen bij veel gebruikte kaarsen kon wel een vermindering van het bacteriophage lysin aangetoond worden, maar nooit meer dan een titerdaling van 1 tot 2 eenheden. Zoo vonden wij in 6 buisjes met ongefiltreerden lysaatbouillon regelmatig titer 9, terwijl van 5 buisjes met denzelfden gefiltreerden lysaatbouillon 3 buisjes met titer 8 aangetroffen werden, 1 buisje met titer 9 en 1 buisje met titer 7. Voor het filtreeren bezigden wij CHAMBERLAND-kaarsen L_1, L_2 en L_5, welke reeds herhaaldelijk gebruikt waren.

Door ons werd vervolgens nagegaan, welken invloed de filtratie uitoefent op het bacteriophage lysin in de verschillende stadia van het lytisch proces. Aan kolven met 50 of 100 c.c. bouillon werden $^1/_2$ of $2^1/_2$ c.c. eener 18-urige SHIGA-bouilloncultuur en $^1/_2$ of $2^1/_2$ c.c. bacteriophaag lysin (titer 4 of 5) toegevoegd; één kolf werd in den thermostaat bij 37° C. gesteld en een andere bij 22° C. Na 2, 3, 4 of 5 uren werd van de vloeistof in de kolven de titer bepaald, zoowel vóór als na het filtreeren door ongebruikte CHAMBERLAND-kaarsen L_3. (Zie Tabellen XXXXI en XXXXII op pag. 102.)

Uit deze proefnemingen blijkt derhalve, dat filtratie een ongunstigen invloed uitoefent in bepaalde stadia van het lysisproces en wel juist in die stadia, waarin de bacteriën in opgezwollen en korreligen toestand verkeeren. (In Tabel XXXXI na 4 uren en in Tabel XXXXII na 3 en 5 uren). Deze toestand der bacteriën staat klaarblijkelijk in verband met de lagere titer, welke na

TABEL XXXXI.

100 c.c. bouillon + $^1/_2$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + $2^1/_2$ c.c. lysin (titer 4), geplaatst bij 37° C.

Tijd (uren).	Titer vóór het filtreeren.	Titer nà het filtreeren.
2	4	4
4	5	4

Na $4^1/_2$ uur trad de lysis op.

TABEL XXXXII.

50 c.c. bouillon + $2^1/_2$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + $^1/_2$ c.c. lysin (titer 5), geplaatst bij 22° C.

Tijd (uren).	Titer vóór het filtreeren.	Titer nà het filtreeren.
3	8	5
5	8	7

Na 5 uren was de lysis juist ingetreden.

filtratie gevonden wordt. Zoo ziet men in Tabel XXXXII na 5 uren, onmiddellijk na de lysis, de titer door de filtratie in geringere mate afnemen dan bij de filtratie na 3 uren. Ook pleit voor deze opvatting het feit, reeds boven vermeld, dat bij ongebruikte kaarsen, eenigen tijd na de lysis, vóór en na de filtratie steeds een zelfde titer gevonden wordt.

* * *

Temperatuur. Ten aanzien van den invloed van de temperatuur op het bacteriophage lysin en op het lysisproces kunnen 3 groepen van temperaturen onderscheiden worden:

I. Temperaturen, waarbij het bacteriophage lysin vernietigd wordt.

II. Temperaturen, waarbij het bacteriophage lysin zijn werking blijft behouden, maar de bacteriën gedood worden.

III. Temperaturen, waarbij het lysisproces plaats vindt.

I. Voor de temperatuur, waarbij het bacteriophage lysin vernietigd wordt, gaf D'HERELLE aanvankelijk op 65° C. Later heeft hij met POZERSKI (152) uitvoeriger de vernietigingstemperatuur onderzocht. Zij vonden deze vernietigingstemperatuur bij 75° C., doch reeds vroeger zou er een vermindering van werkzaamheid van het lysin te constateeren zijn. Deze vermindering trad voor een bacteriophaag lysin tegen SHIGA-bacillen, colibacillen, enz. bij 66° C. op, voor een bacteriophaag tegen paratyphus A-bacillen bij 64° C., voor een bacteriophaag tegen typhusbacillen bij 62° C. en voor een bacteriophaag tegen staphylococcen bij 60° C.

KABESHIMA (153, 154) vond bij het bacteriophage lysin, waarmede hij werkte, 75° C. als de vernietigende temperatuur; een verwarming op 60—70° C. werd volgens hem zelfs bij een 10-voudige herhaling zeer goed verdragen.

GRATIA en JAUMAIN (155) legden het eerst nadruk op het feit, dat de verschillende bacteriophage lysinen een uiteenloopende vernietigingstemperatuur bezitten; een bacteriophaag lysin tegen staphylococcen werd bij 60° C. en een bacteriophaag lysin tegen colibacillen bij 70° C. vernietigd.

FLU vond bij 75° C. een totale vernietiging.

BRUYNOGHE en MAISIN (156) vonden eveneens 75° C. als de vernietigingstemperatuur en daar beneden reeds een reductie. Deze reductie bleef dezelfde, hetzij zij gedurende 5 minuten of gedurende 2 uren op 70° C. verwarmden.

J. DE NECKER constateerde, dat beneden 48° C. geen enkel lysin een schadelijken invloed ondervindt; een verwarming op 48°—60° C. veroorzaakt een geringe inactiveering en boven 60° C. neemt deze inactiveering snel toe, verschillend snel bij verschillende bacteriophage lysinen, terwijl na een verwarming op 75° C. elke werking is opgeheven.

Volgens WEINBERG (87, 88) en HAUDUROY (157) is de virulentie van den bacteriophaag van beteekenis voor den invloed van de temperatuur: de weerstand van den bacteriophaag tegen de temperatuur neemt volgens hen namelijk toe met de virulentie. Een bacteriophaag lysin, dat na de verwarming zijn activiteit verloren heeft, krijgt zijn lytisch vermogen niet terug, indien het

aan zich zelf overgelaten wordt. Indien men echter met een dergelijk verwarmd bacteriophaag lysin enkele passages verricht, dan komt volgens HAUDUROY het lytisch vermogen weer te voorschijn. De temperatuur, waarbij dan ook volgens hem het bacteriophage lysin met absolute zekerheid totaal vernietigd wordt, ligt bij 100—102° C. in vochtig milieu en bij 135° C. in drogen toestand.

J. TCHANG KOUO NGEN en J. WAGEMANS (158, 159) zijn van meening, dat bij verwarming op 80° C. reeds absoluut zeker een totale vernietiging optreedt.

A. SEISER vond, dat onverdund lysin na verwarming gedurende 50 minuten op 65° C. nog 141 „taches" gaf en 100-voudig verdund lysin na deze verwarming geen enkele „tache" deed optreden.

Ook YASAKI (116) kreeg analoge resultaten.

DOERR (17) concludeerde in zijn overzicht, dat na verwarming op 56°—64° C. een verzwakking van het bacteriophage lysin wordt waargenomen en na verwarming op 65°—75° C. een totale vernietiging.

S. OKUDA (160 en 161) vond bij een bacteriophaag lysin tegen bac. pyocyaneus 70° C. als vernietigingstemperatuur.

Ook H. VON PREISZ zag zijn SHIGA-bacteriophaag totaal vernietigd worden na een verwarming gedurende $^1/_2$ uur op 70° C.

TAI WATANABE (162), die bij zijn proefnemingen onverdunden lysaatbouillon gebruikte, constateerde evenals GRATIA, dat een bacteriophaag lysin, dat op een scheefagarvlakte kleine „taches" gaf, bij 70° C. en een bacteriophaag lysin (tegenover dezelfde bacterie), dat op een scheefagarvlakte tot het ontstaan van groote „taches" aanleiding gaf, bij 60°—62° C. vernietigd werd. WATANABE beschouwde beide bacteriophage lysinen als zijnde verschillend in soort en concludeerde, dat het bacteriophage lysin, dat kleine „taches" gaf, het meest resistente lysin was. SCHUURMAN daarentegen is van meening, dat men hier te doen heeft met één bacteriophaag, die echter verschillende virulenties bezit; de grootte van de „taches" toch werd door WOLFF en JANZEN (163, 164) afhankelijk gesteld van den graad van virulentie. Daarom moeten volgens SCHUURMAN de resultaten van de proefnemingen van WATANABE zóó geïnterpreteerd worden, dat de bacteriophaag, die groote „taches" gaf, door een verwarming op 60°—62° C.

veranderd werd (virulentievermindering) in een bacteriophaag, die kleine „taches" verwekte; boven 70° C. werd dan de bacteriophaag geheel geïnactiveerd.

Samenvattende, blijkt derhalve:

1°. dat de vernietigingstemperatuur voor verschillende bacteriophage lysinen verschillend is (70°—75° C. en hooger);

2°. dat de temperatuurbreedte voor de inactiveering van het bacteriophage lysin schommelt tusschen 48° C en 75° C.; binnen deze grenzen neemt de intensiteit van inactiveering toe met het stijgen van de temperatuur, bij verschillende bacteriophage lysinen in uiteenloopende mate; en

3°. dat de invloed van de temperatuur ook bepaald wordt door de concentratie (resp. de virulentie) van het bacteriophage lysin.

II. Bordet en Ciuca (9) geven aan, dat in een mengsel van bacteriophaag lysin en bacteriën, door verwarming gedurende $^1/_2$ uur op 58° C., het lysin geïsoleerd kan worden; de bacteriën sterven af, doch het lysin blijft zijn werking behouden.

A. Saldanha (109) verwarmt, om dit doel te bereiken, gedurende $^1/_2$ uur op 60° C.

Anderen nemen deze temperatuur iets lager; zij verwarmen namelijk gedurende $^1/_2$ uur op 56° C. (Appelmans, Bruynoghe en Maisin, Joetten, Meuli, e. a.).

Otto en zijn medewerkers zijn van meening, dat de hoogste titer gevonden wordt, indien het uitgangsmateriaal gedurende $^1/_2$ uur op 60° C. wordt verwarmd en daarna wordt gefiltreerd; volgens J. de Necker (144) echter doet reeds een verwarming op 48° C. het bacteriophage lysin in werking verminderen.

Wij hebben kolven genomen met 50 c.c. of 100 c.c. bouillon, waarin verschillende hoeveelheden 18-urige Shiga-bouilloncultuur ($^1/_2$ of $2^1/_2$ c.c.) en verschillende quantiteiten bacteriophaag lijsin ($^1/_2$ c.c. of $2^1/_2$ c.c.) met titer 4 of 5 gebracht werden; op verschillende tijdstippen werd de titer vóór en na een verwarming gedurende $^1/_2$ uur op 58° C. bepaald. Eén kolf werd in den thermostaat bij 37° C. en een andere bij 22° C. geplaatst. (Zie Tabellen XXXXIII en XXXXIV op pag. 106.)

TABEL XXXXIII.

100 c.c. bouillon + $^1/_2$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + $2^1/_2$ c.c. lysin (titer 4), geplaatst bij 37° C.

Tijd (uren).	Titer vóór het verwarmen.	Titer nà het verwarmen.
1	3	3
2	4	4
3	5	5
4	5	4

Na $4^1/_2$ uur lysis.

TABEL XXXXIV.

50 c.c. bouillon + $2^1/_2$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + $^1/_2$ c.c. lysin (titer 5), geplaatst bij 22° C.

Tijd (uren).	Titer vóór het verwarmen.	Titer nà het verwarmen.
3	8	5

Wij vonden derhalve geen bevorderenden invloed, maar integendeel in eenige gevallen een verzwakkenden invloed op het bacteriophage lysin door een verwarming gedurende $^1/_2$ uur op 58° C.

III. D'HERELLE (6) gaf reeds aan, dat de temperatuur op het lytisch proces invloed heeft; die temperatuur, waarbij de microorganismen het best groeien, is optimaal ook voor de lysis.

DOERR en GRÜNINGER (16) hebben den invloed van de temperatuur op het lysisproces uitvoeriger nagegaan. Bij 30° C. zagen zij de lysis iets later intreden. Lage temperatuur verlengt de lysislatentie en de bacteriënvermeerdering gaat ook langzamer. Bij 43° C. zagen zij wel een sterke bacteriënvermeerdering optreden (zij werkten met colibacillen), maar geen lysintoeneming; na het 6e uur was integendeel al het lysin verdwenen. Lysis kwam ook niet tot stand; de bacteriën waren niet lysogeen. Aan deze verhoudingen ontleenen zij een argument voor hun opvat-

ting, dat de bacteriënvermeerdering als zoodanig (zonder pathologische stofwisseling) niet de lysin-productie kan verklaren.

Volgens OTTO en MUNTER (61) bestaat er een nauw verband tusschen bacteriëngroei en lysinvorming. Bacteriëngroei is afhankelijk van de temperatuur, derhalve ook de lysin-productie.

C. C. CHOU (61) ging het lysisproces na bij 8° C., 22° C., 37° C., enz. en vond als grenzen voor het tot stand komen der lysis 0° C. en 42° C. De lysinvorming komt bij die uiteenloopende temperaturen op verschillende tijden en wel het snelst bij 37° C. tot stand; beneden 8° C. heeft geen lysinvorming plaats.

Volgens A. KUTTNER (54) zou het bacteriophage lysin bij 41° C. in optimale temperatuursverhouding verkeeren.

H. v. PREISZ is van meening, dat 38° C. de optimale temperatuur is voor de lysis. Bij 43° C. en 44° C. verkreeg hij, werkende met SHIGA-bacillen en SHIGA-lysin, geen lysis, ofschoon de bacteriën zich sterk vermeerderden. Hij komt derhalve tot hetzelfde resultaat als DOERR en GRÜNINGER.

Volgens C. SCHUURMAN is de invloed van een lagere temperatuur bij gelijkblijvende P_H deze, dat de lysis langzamer verloopt door de langzamere ontwikkeling der bacteriëncultuur; bovendien komt alsdan de lysis ook dikwijls minder compleet tot stand. De vermenigvuldiging van den bacteriophaag zou volgens hem bij lagere temperaturen minder intensief zijn (bij 22° C. de helft van die bij 37° C.).

Evenals bij 37° C. werd voor onze proefnemingen bij 22° C. eerst onze SHIGA-bouilloncultuur zonder bacteriophaag lysin in haar verloop bij 22° C. onderzocht op de verhouding van het aantal kweekbare tot het aantal microscopisch telbare bacteriën; tevens werd uit de verkregen gegevens de generatieduur bij die temperatuur bepaald. Voor het onderzoek werden kolven genomen met 25 c.c. bouillon, waarbij 1 c.c. eener 18-urige SHIGA-bouilloncultuur werd gevoegd; de kolven werden in den thermostaat van 22° C. geplaatst. Onmiddellijk na de toevoeging der SHIGA-bacillen en verder na 3, 6, 9 uren, enz. werden de aantallen bacteriën volgens de KLEIN'sche en KOCH'sche methode vastgesteld.

TABEL XXXXV.

25 c.c. bouillon + 1 c.c. SHIGA-bouilloncultuur.

Tijd (uren).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Verhoudingsgetal.
0	4000	5582	72
3	5900	7906	75
6	18200	21797	84
9	56000	63281	84
12			
24	83000	105468	79
48	120000	234545	51
72			
96			

TABEL XXXXVI.

25 c c. bouillon + 1 c.c. SHIGA-bouilloncultuur.

Tijd (uren).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Verhoudingsgetal.
0	2620	3516	74
3	5100	5625	91
6	15600		
9	54000	66796	83
12			
24	122000	151171	81
48	123000	172264	73
72			
96	248000	482637	51

TABEL XXXXVII.

25 c.c. bouillon + 1 c.c. SHIGA-bouilloncultuur.

Tijd (uren).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Verhoudingsgetal.
0	3807	5273	72
3	6400	6680	96
6	22000	26719	81
9	57000	59765	91
12		101952	
24	134000	161718	82
48			
72	212000	404294	51
96			

Het verhoudingsgetal bedraagt na 3 uren groei bij 22° C. in Tabel XXXXV 75, in Tabel XXXXVI 91 en in Tabel XXXXVII 96; op dit tijdstip zijn alle bacillen met zekerheid nog in levenden toestand aanwezig. Na 24 uren zien wij ongeveer dezelfde verhoudingsgetallen optreden, zoodat aangenomen kan worden, dat ook dan nog alle aanwezige bacillen levend zijn. Indien wij, om een goed gemiddelde te verkrijgen, het gemiddelde nemen van alle proefnemingen (14) tot en met 24 uren, dan vinden wij een verhoudingsgetal van 81, ongeveer hetzelfde verhoudingsgetal als bij 37° C. (83) gevonden werd. Het blijkt dus, dat zoowel bij 22° C. als bij 37° C. gecultiveerd, in de bouillonculturen van SHIGA-bacillen tot en met 24 uren nog geen afgestorven bacteriën voorhanden zijn. Na 48 uren en later zijn de verhoudingsgetallen zeer belangrijk gedaald; in Tabel XXXXV na 48 uren tot 51, in Tabel XXXXVI na 48 uren tot 73 en na 96 uren tot 51 en in Tabel XXXXVII na 72 uren tot 51; hieruit kan dus geconcludeerd worden, dat op deze tijdstippen reeds een belangrijke afsterving in de culturen heeft plaats gevonden. Deze afsterving heeft in

bouillonculturen van SHIGA-bacillen bij 37° C. sneller plaats dan in die van 22° C., zooals uit de veel kleinere verhoudingsgetallen bij 37° C. na 48, 72 en 96 uren blijkt.

De generatieduur, op dezelfde wijze als bij 37° C. is aangegeven, berekend, bedraagt in Tabel XXXXV gedurende de periode van 3 tot 6 uren $112^1/_2$ minuut; eveneens werd in het tijdperk van 6 tot 9 uren een generatieduur van $112^1/_2$ minuut gevonden. In Tabel XXXXVI werd in de periode van 3 tot 6 uren een generatieduur van 112 minuten en in de periode van 6 tot 9 uren een generatieduur van 100 minuten aangetroffen. In Tabel XXXXVII bedraagt de generatieduur in het tijdperk van 3 tot 6 uren 100 minuten en van 6 tot 9 uren 131 minuten. Voor het kweeken bij een temperatuur van 22° C. kan derhalve (de bepalingen gedurende de tijdperken van 3 tot 6 uren genomen) een gemiddelden generatieduur van $^{324}/_3 = 108$ minuten aangenomen worden (bij 37° C. bedroeg de gemiddelde generatieduur 38 minuten).

Kolven met 50 of 100 c.c. bouillon werden gedurende eenigen tijd in den thermostaat bij 22° C. geplaatst, zoodat bij het begin van de proefneming de temperatuur van den bouillon 22° C. bereikt had. Aan de kolven werden 5 c.c. eener 18-urige SHIGA-bouilloncultuur toegevoegd, waarna de aantallen kweekbare en microscopisch telbare bacteriën werden bepaald. Vervolgens werd in de kolven $^1/_2$ of 1 c.c. lysin met uiteenloopende titer (4, 5, 6, 7 en 10) gebracht en werden onmiddellijk daarna weder de aantallen kweekbare en microscopisch telbare bacteriën, benevens de titer vastgesteld. De kolven werden nu in den thermostaat bij 22° C. geplaatst. Op verschillende tijdstippen werden de bepalingen van het aantal kweekbare en microscopische telbare bacteriën en van het lysin herhaald. Zie Tabellen XXXXVIII tot en met LIII.

Kweekbare bacteriën. De toeneming van het aantal kweekbare bacteriën duurt bij een lagere begintiter langer dan bij een hoogere begintiter. In Tabel IL, met begintiter 3—4, bedraagt de duur van de toeneming van het aantal kweekbare bacteriën 6 uren; in Tabel L, met begintiter 4, is na 5 uren reeds een sterke vermindering van het aantal kweekbare bacteriën op te merken; in

TABEL XXXXVIII.

50 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + $^1/_2$ c.c. lysin (titer 5—6).

Tijd (uren).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Afsterving. Aantal afgestorven bacteriën.	Afsterving. Steriliteits-percentage.	Afsterving. Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.	Generatie-duur (minuten.)	Troebelheid.	Lysin-titer.
0	5900	7283	7031					+	3—4
1	7100	8765	9192	427		} 10		+	
3	9500	11728	13128	1400	11	} 15	} 86	++	5
4	13000	16049	20390	4341	22			+++	
14								0	

TABEL IL.

100 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 5).

Tijd (minuten).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën. totaal	Aantal microsc. telbare bacteriën. abnorm.	Afsterving. Aantal afgestorven bacteriën.	Afsterving. Steriliteits-percentage.	Afsterving. Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.	Troebelheid.	Lysin-titer.
Te voren	5020		5977					+	
0	5100	6296						+	3—4
3	5400	6667	11955		5288	44	} 34	++	5
6	7400	9135	19160		10025	52	} 96	++	6
9	140	172	16172	16172	16000	98		+++	7
12	0	0	12656	12656	12656	100		++++	8
24	—							0	9

TABEL L.

100 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 6).

Tijd (uren).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Afsterving. Aantal afgestorven bacteriën.	Sterilitetspercentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.	Generatieduur (minuten).	Troebelheid.	Lysin-titer.
Te voren	3500		4210					+	
0	3600	4444	4570	126				+	4
2	7200	8889	14414	5525	30	} 43		++	
3	8000	9877	21094	11217	53	} 37	} 75	+++	5
5	1700	2098	24609	22511	91	} 89		++++	
6	20	24	27422	27398	99	} 99		+++++++	6
9	0		enkele *b.*					0	9

TABEL LI.

100 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 7).

Tijd (uren).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.		Afsterving.			Troebelheid.	Lysin-titer.
			totaal	abnorm.	Aantal afgestorven bacteriën.	Sterilitetspercentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.		
Te voren	830							+	
0	650	802					} 82	+	5
3	1000	1234	6855	1406	5621	82	} 98	++	8
7	40	49	8789	8086	8740	99		++	9
10								0	10

TABEL LII.

100 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 7).

Tijd (uren).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Afsterving			Troebelheid.	Lysentiter.
				Aantal afgestorven bacteriën.	Steriliteitspercentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.		
Te voren	3240		3867				+	
0	3100	3827	4229	402	9	} 56	+	5
3	2500	3086	7483	4397	59	} 88	+	6
6	730	901	12053	11152	92	} 98	++	
7	20	24	13008	12984	99		+++	
8	10	12	8970	8958	99		+++	
9	0		2812	2812	100		+	8
10	0						0	10

TABEL LIII.

50 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + 1 c.c. lysin (titer 10).

Tijd (uren).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.		Afsterving.			Troebelheid.	Lysintiter.
			totaal	abnorm.	Aantal afgestorven bacteriën.	Steriliteitspercentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.		
Te voren	7940		8965				} 92	++	
0	480	592	7735		7143	92	} 97	++	8
1	25	31	8438	4395	8407	99		++	7
2	20	24	4921	3691	4897	99		++	7
5	0		weinig					0	8

Tabel LI, met begintiter 5, is tot 3 uren een toeneming van het aantal kweekbare bacteriën te constateeren en in Tabel LIII, met begintiter 8, is in het geheel geen toeneming van het aantal kweekbare bacteriën meer waar te nemen.

De daling van het aantal kweekbare bacteriën komt snel tot stand, indien bacteriophaag lysin met hooge titer is toegevoegd; in Tabel LIII is onmiddellijk na de toevoeging van het lysin het aantal bacteriën gedaald van 7940 tot 480 en daarna in 1 uur van 480 tot 25. Bij lagere begintiters geschiedt de daling van het aantal kweekbare bacteriën hier langzamer (3—6 uren) dan bij 37° C.; in Tabel L is het aantal kweekbare bacteriën in 3 uren gedaald van 8000 tot 20.

Levende bacteriën. Uit de vergelijkende proefnemingen tusschen de KLEIN'sche en KOCH'sche telmethode vonden wij, dat het aantal kweekbare bacteriën gemiddeld 81 % bedraagt van het werkelijk aantal aanwezige levende bacteriën; de aantallen levende bacteriën werden ook hier in de tabellen opgenomen.

Microscopisch telbare bacteriën. Het aantal microscopisch telbare bacteriën neemt in de eerste periode veel sterker toe dan het aantal levende bacteriën en wel des te sterker, naarmate de begintiter hooger is. In Tabel IL, met begintiter 3 tot 4, is van 3 tot 6 uren het aantal microscopisch telbare bacteriën met ongeveer 7000 toegenomen en het aantal levende bacteriën slechts met 2000; in Tabel L, met begintiter 4, bedraagt de toeneming van het aantal levende bacteriën van 2 tot 3 uren 800 en van het aantal microscopisch telbare bacteriën ongeveer 6600 en in Tabel LI, met begintiter 5, is het verschil in toeneming der beide aantallen nog grooter geweest.

Na het bereiken van het maximale aantal levende bacteriën blijft bijna regelmatig het aantal microscopisch telbare bacteriën nog toenemen; in Tabel L b.v. van 21094 tot 27422, in Tabel LI van 6855 tot 8789, in Tabel LII van 4229 tot 13008. Eerst 3 tot 7 uren (bij 37° C. 30 tot 90 minuten) na het begin van de afneming van het aantal levende bacteriën heeft het aantal microscopisch telbare bacteriën zijn maximum bereikt en begint daarna te verminderen. Gedurende deze periode van 3 tot 7 uren na het

bereiken van het maximum aantal levende bacteriën is derhalve ook bij 22° C. nog een vermeerdering van levende bacteriën te constateeren. De vermindering van het aantal microscopisch telbare bacteriën neemt 3 tot 6 uren en langer in beslag (bij 37° C. ongeveer 60—120 minuten). In Tabel L begint het aantal levende bacteriën na 3 uren te verminderen; na 6 uren neemt de daling van het aantal microscopisch telbare bacteriën een aanvang, terwijl na 9 uren in het microscopisch praeparaat slechts weinig bacillen meer waarneembaar zijn. In Tabel LII is onmiddellijk na de toevoeging van het bacteriophage lysin het maximum aantal levende bacteriën gevonden, 7 uren later het maximale aantal microscopisch telbare bacteriën en na 10 uren zijn geen bacillen microscopisch meer waarneembaar.

Afsterving der bacteriën. Reeds in de eerste periode zijn een aantal afgestorven bacteriën voorhanden en dit aantal is des te grooter, naarmate een hoogere begintiter voor de proefneming gebezigd werd. De aantallen afgestorven bacteriën nemen in het verloop van het proces intensief toe en worden 3 tot 7 uren (bij 37° C. 30 tot 90 minuten) na het bereiken van het grootste aantal levende bacteriën maximaal. In Tabel L b.v. zijn na 2 uren 5525 bacteriën afgestorven, na 3 uren 11217, na 5 uren 22511 en na 6 uren 27398.

In Tabel IL, met begintiter 3—4, wordt na 3 uren een steriliteitspercentage van 44 gevonden; in Tabel L, met begintiter 4, is het steriliteitspercentage na 2 uren 30 en na 3 uren 53; in Tabel LI, met begintiter 5, is na 3 uren het steriliteitspercentage 82 en na 7 uren 99 en in Tabel LIII, met begintiter 8, is onmiddellijk na de toevoeging van het lysin het steriliteitspercentage 92 en na 1 uur 99. De steriliteitspercentages blijken derhalve reeds in de eerste periode aanzienlijk gestegen te zijn. Bij hoogere begintiters zijn de steriliteitspercentages hooger dan bij lagere begintiters en is derhalve de afsterving intensiever; bij de hoogere initiaaltiters begint de afsterving reeds onmiddellijk na de toevoeging van het bacteriophage lysin.

Tijdens en vooral na het bereiken van het maximale aantal levende bacteriën worden de steriliteitspercentages zeer groot.

In Tabel L b.v. is na 3 uren (maximum aantal levende bacteriën) het steriliteitspercentage 53, na 5 uren 91 en na 6 uren 99.

Gedurende het geheele verloop van het lytisch proces heeft derhalve ook bij 22° C. een voortdurende en toenemende afsterving plaats.

De toenemende intensiteit van afsterving in de verschillende perioden van het lytisch proces blijkt duidelijk uit de sterftecijfers. Vooral in de periode na het dalen van het aantal levende bacteriën is het sterftecijfer zeer hoog, de intensiteit van afsterving derhalve zeer belangrijk. In Tabel L b.v. bedraagt het sterftecijfer in de periode van 0 tot 2 uren 43, van 3 tot 5 uren 89 en van 5 tot 6 uren 99; het aantal levende bacteriën daalt reeds na 3 uren. In de geheele periode vóór het bereiken van het maximale aantal levende bacteriën (van 0 tot 3 uren) wordt reeds een sterftecijfer van ongeveer 40 gevonden, in de geheele periode daarna (van 3 tot 6 uren) een sterftecijfer van 95.

Vermeerdering der bacteriën (generatieduur). De berekening van den generatieduur stuit hier dikwijls op onoverkomelijke bezwaren. De afsterving, die reeds spoedig begint (b.v. Tabellen LI, LII en LIII), voert ook zeer snel tot een oplossing van bacteriën: er worden dan ook reeds zeer vroeg abnorme vormen aangetroffen (in Tabel LIII b.v. reeds na 1 uur). Derhalve waren wij dikwijls ook zelfs niet met behulp van de aantallen microscopisch telbare bacteriën in staat den generatieduur vast te stellen. In Tabel L werd een generatieduur van 75 minuten berekend, welke generatieduur derhalve belangrijk kleiner is dan de generatieduur in een SHIGA-bouilloncultuur zonder bacteriophaag lysin bij 22° C. (108 minuten). In Tabel XXXXVIII werd een generatieduur van 86 minuten gevonden. In Tabel LI is uit de verhouding van het aantal levende bacteriën in het begin van het proces (802) tot het aantal microscopisch telbare bacteriën na 3 uren (6855) eveneens een veel kortere generatieduur dan de normale te concludeeren. In de eerste periode van het lytisch proces bij 22° C. is derhalve eveneens een verkorte generatieduur, een verhoogde intensiteit van vermeerdering, te constateeren.

Troebelheid. Een evenredigheid tusschen de intensiteit van troebelheid en het aantal levende bacteriën bestaat niet. In Tabel LII werden onmiddellijk bij den aanvang van het proces 3827 levende bacteriën gevonden; na 3 uren is het aantal levende bacteriën reeds gedaald tot 3086, terwijl eerst op dat oogenblik een troebelheid zichtbaar wordt; na 6 uren is het aantal levende bacteriën gedaald tot 901 en na 7 uren tot 24, terwijl de intensiteit van troebelheid nog is toegenomen.

De troebelheid loopt in het begin van het proces wel parallel met het aantal microscopisch telbare bacteriën. In Tabel L b.v. worden onmiddellijk na de toevoeging van bacteriën en lysin aan den bouillon microscopisch 4570 bacteriën geteld, na 2 uren 14414 en na 3 uren 21094; de troebelheid wordt op die tijdstippen respectievelijk aangegeven met +, ++, +++.

Na de daling van het aantal microscopisch telbare bacteriën blijft de troebelheid dikwijls nog toenemen, in sommige gevallen zelfs zeer intensief, zooals bv. in Tabel IL te zien is: na 6 uren wordt het maximum aantal microscopisch telbare bacteriën gevonden, terwijl na 9 en 12 uren de troebelheid nog veel intensiever is geworden. Hier wordt dus dezelfde merkwaardige verhouding ten aanzien van de troebelheid geconstateerd als bij 37° C. het geval was.

De lysis komt veel later tot stand dan bij de proefnemingen, die bij 37° C. verricht zijn, en wordt ongeveer 3 tot 4 uren na de maximale afsterving waargenomen (bij 37° C. duurde deze periode 60—120 minuten); de afsterving is primair, de lysis secundair.

Lysin-titer. De toeneming van de lysinhoeveelheid tot de maximale titer wordt bij 22° C. even constant bereikt als bij 37° C.; de meening van SCHUURMAN, dat bij 22° C. minder bacteriophagen worden gevormd dan bij 37° C., kunnen wij derhalve op grond van deze proefnemingen niet als juist aannemen. De maximale titer wordt steeds tijdens de lysis bereikt: in Tabel L na 9 uren, in Tabel LI en LII na 10 uren. Bij de hoogste begintiter (Tabel LIII) is evenmin als bij 37° C. een titerstijging waar te nemen; de eindtiter wordt niet bereikt.

De titer neemt niet alleen in de eerste periode, maar ook nog daarna regelmatig toe; deze regelmatige titerstijging is hier nog duidelijker af te lezen dan in de proefnemingen, die bij 37° C. verricht zijn. In Tabel IL bv. wordt na 6 uren het maximum aantal levende en microscopisch telbare bacteriën aangetroffen, de titer is van 3-4 tot 6 gestegen; vanaf 6 tot 12 uren is geen vermeerdering van bacteriën meer te constateeren, terwijl niettemin de titer van 6 tot 8 is toegenomen. In Tabel LII wordt reeds onmiddellijk het maximum aantal levende bacteriën gevonden en bedraagt de titer 5; na 7 uren is het maximum aantal microscopisch telbare bacteriën bereikt en van 7 tot 10 uren is, zonder dat vermeerdering van bacteriën meer plaats vindt, toch de titer minstens nog 2 eenheden gestegen. Ook bij 22° C. vindt dus gedurende de phase van intensieve afsterving, evenals zulks bij 37° C. het geval was, nog een belangrijke titerstijging plaats.

Opmerkelijk was, dat bij de proefnemingen bij 22° C. steeds snel en constant een secundaire troebelheid ontstond, hetgeen ook bij de titerbepalingen volgens Appelmans bij plaatsing der buisjes bij 37° C. te constateeren was. Ter demonstratie vermelden wij de volgende proefnemingen:

1. Van 2 buisjes, waarin zich lysaatbouillon (titer 7) bevond, welke bij 37° C. gevormd was en geënt was met Shiga-bacillen, werd het eene buisje bij 37° C. en het andere bij 22° C. geplaatst. Na 6 uren werd in beide buisjes lysis waargenomen. Het buisje, dat bij 22° C. gestaan had, werd na 36 tot 48 uren secundair troebel, terwijl het buisje uit den thermostaat van 37° C. helder bleef.

2. Van 2 buisjes, waarin zich lysaatbouillon (titer 7) bevond, welke bij 22° C. gevormd was en geënt was met Shiga-bacillen, werd het eene buisje bij 37° C. en het andere bij 22° C. gesteld. Het buisje, bij 37° C. geplaatst, vertoonde na 6 uren lysis, maar werd spoedig daarna secundair troebel; het buisje, dat bij 22° C. gesteld was, vertoonde eveneens lysis, welke eerst na 36 tot 48 uren in een secundaire troebelheid overging. De secundaire

cultuur, welke in lysaatbouillon, die het lysisproces bij 22° C. doorgemaakt heeft, constant optreedt, zoowel bij 37° C. als bij 22° C., komt bij 37° C. sneller tot stand wegens de optimale temperatuursverhouding voor de vermeerdering der bacteriën.

Geheel op dezelfde wijze als in de proefnemingen bij 22 C. en 37° C. werden kolven met 50 c.c. bouillon, $2^1/_2$ of 5 c.c. 18-urige SHIGA-bouilloncultuur en $^1/_2$ c.c. lysin met uiteenloopende titers (5, 6, 10, 11) in den thermostaat bij 44° C. geplaatst en werd het verloop van het lysisproces bij deze temperatuur nader ondcrzocht.

TABEL LIV.

50 c c. bouillon + $2^1/_2$ c.c. SHIGA-bouilloncultuur + $^1/_2$ c c. lysin (titer 5).

Tijd (uren).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Afsterving.			Troebelheid.	Lysintiter.
				Aantal afgestorven bacteriën.	Sterilitetspercentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.		
0	3200	3850	3867				+	2—3
1							+	3
2	12200	14700	16078	1378	9	} 99	++++	6
3	90	107	17754	17647	99		++++	8
4	1		3164	3163	100		+	8
5							0	

TABEL LV.

50 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + $^1/_2$ c.c. lysin (titer 6).

Tijd (uren).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Afsterving.			Generatieduur (minuten).	Troebelheid.	Lysintiter.
				Aantal afgestorven bacteriën.	Sterilitetspercentage.	sterftecijfer per 100 levende bacteriën.			
0	6920	8096						++	4
1	10100	12166	14414	2248	15	} 95	} 33	+++	5
2	1430	1722	41836	40114	96			++++	6
3	10	12	33222	33210	99			++++	6
4								0	10

TABEL LVI.

50 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + $^1/_2$ c.c. lysin [titer 10).

Tijd (min).	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aahtal microsc. telbare bacteriën.	Afsterving.			Troebelheid.	Lysintiter.
				Aantal afgestorven bacteriën.	Sterliteits-percentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.		
0	6900	8308	9492	1192	13	} 99	++	8
60	10	12	12656	12644	99		+++	9
120	0						0	11

TABEL LVII.

50 c.c. bouillon + 5 c.c. SHIGA-bouilloncultuur + $^1/_2$ c.c. lysin (titer 11).

Tijd (min.)	Aantal kweekbare bacteriën.	Aantal levende bacteriën.	Aantal microsc. telbare bacteriën.	Afsterving.			Troebelheid.	Lysintiter.
				Aantal afgestorven bacteriën.	Sterliteits-percentage.	Sterftecijfer per 100 levende bacteriën.		
Tevoren	6760		8086				++	0
0	6320	7613	9492	1879	20	} 97	++	9
60	15	18	2637	2619	99		+	9
120							0	9

Het verloop bij 44° C. komt, zooals uit deze proefnemingen blijkt, geheel overeen met dat van 37° C. De titer bereikt hier tijdens de lysis steeds de maximale eindtiter.

DOERR en GRÜNINGER, die bij 43° C met coli-bacillen en colilysin werkten en VON PREISZ, die bij dezelfde temperatuur met SHIGA-bacillen en SHIGA-lysin experimenteerde, verkregen bij die temperatuur noch lysis, noch titerstijging; deze resultaten vinden in onze proefnemingen dus geen bevestiging.

Ten einde den invloed van de verschillende temperaturen nog eens vergelijkenderwijs bij alle begintiters na te gaan, werden eenige verdunningsreeksen volgens APPELMANS in den thermostaat van

22° C., 37° C., 40° C. en 44° C. geplaatst. Van eenige buisjes werd een titerbepaling verricht; van enkele buisjes bij 22° C. werden op verschillende tijdstippen de aantallen kweekbare en microscopisch telbare bacteriën vastgesteld.

TABEL LVIII.

No.	Lysin-titer.	22° C.		37° C.		Eindtiter.	
		Begin van troebelheid (in uren).	Lysis (in uren).	Begin van troebelheid (in uren).	Lysis (in uren).	22° C.	37° C.
I	9	helder	helder	helder	helder		
II	8	helder	helder	helder	helder		
III	7	helder	helder	helder	helder		
IV	6	3½	10½	2	3½	10	10
V	5	3½	13	2	5		
VI	4	3½	17	2	5	10	10
VII	3	3½	18	2	6		
VIII	2	3½	18½	2	8		
IX	1	3½	21	2	9		
X	0	3½	21—24	2	10½		
C		3½		2			

TABEL LIX.

No.	Lysin-titer.	Lysis in uren.			Eindtiter.	
		37° C.	40° C.	44° C.	37° C.	44° C.
I	9	helder	helder	helder	9	9
II	8	2½	2½	2½		
III	7	3½	2½	2½	10	10
IV	6	3½	2½	2½		
V	5	4½	3½	2½		
VI	4	6	4	3	10	10
VII	3	7½	4	3½		
VIII	2	7½	5½	4½	10	10
IX	1	8½	7½	5½		
X	0	8½	7½			

TABEL LX.

No. van het buisje.	Begin-titer.	Onderzoek na begin van het proces.	Troebelheid.		Levende bacteriën.		Microsc. telbare bacteriën.
			Begin (in uren).	Lysis (in uren).	lus.	$^1/_{10}$ c.c.	
V	5	11 uren	$3^1/_2$	13	8		7207
V	5	13 uren	$3^1/_2$	13		2	—
VIII	2	11 uren	$3^1/_2$	$18^1/_2$	196		10195
VIII	2	17 uren	$3^1/_2$	$18^1/_2$	1		2461
VIII	2	$18^1/_2$ uur	$3^1/_2$	$18^1/_2$		0	
C		11 uren	$3^1/_2$		9400		
C		17 uren	$3^1/_2$		38700		43950

Uit deze proefnemingen, voor elk der beide Tabellen LVIII en LIX met dezelfde aantallen bacteriën verricht, blijkt duidelijk, dat de lysis des te sneller optreedt, naarmate de temperatuur hooger is; bij 44° C. sneller dan bij 40° C., bij 40° C. sneller dan bij 37° C. en bij 37° C. veel sneller dan bij 22° C. Bij alle temperaturen werd de maximale titer bereikt.

Een proefneming bij 45° C. gaf geen resultaat, daar bij die temperatuur geen vermeerdering der SHIGA-bacillen optrad.

HOOFDSTUK V.

Samenvattende beschouwingen.

Onze onderzoekingen over de bacteriophage lysis van SHIGA-bacillen in vloeibaar milieu, waarbij naast de cultuurmethode van KOCH de microscopische telmethode van KLEIN werd toegepast, hebben ons ten aanzien van het ***verloop der bacteriënbevolking*** tijdens het lysisproces tot de volgende conclusiën gevoerd.

1⁰. Na een latentieperiode van gewonen duur (45-60 minuten bij 37° C., 60 minuten bij 22°. C.), begint, onder den invloed van het bacteriophage lysin, de *vermeerdering* der bacteriën aanvankelijk met dezelfde snelheid als in een SHIGA-bouilloncultuur zonder bacteriophaag lysin. Reeds spoedig echter wordt deze vermeerdering intensiever en verkrijgt haar grootste intensiteit korten tijd vóór, tijdens en ook nog eenigen tijd na het bereiken van het maximale aantal levende bacteriën.

Tot deze intensievere vermeerdering is geconcludeerd op grond van de volgende waarnemingen.

a. De verkorte generatieduur; deze bedraagt in eenige experimenten o.a. 17 minuten, 22 minuten, 23 minuten, 33 minuten (normaal 38 minuten) bij 37° C. en 75 minuten, 86 minuten (normaal 108 minuten) bij 22° C.

b. De aanwezigheid in de microscopische praeparaten, gemaakt in den aanvang van het lysisproces (bij 37° C. ongeveer 60—180 minuten na het begin van het proces), van een grooter aantal deelingsvormen dan in een contrôle-SHIGA-bouilloncultuur van denzelfden leeftijd zonder lysin.

c. Het vroeger en intensiever troebel worden der SHIGA-bouillonculturen met lysin, in vergelijking met SHIGA-bouillonculturen zonder lysin.

2⁰. Reeds zeer vroegtijdig treedt bij het lysisproces naast de

vermeerdering een *afsterving* van bacteriën op, welke afsterving in den verderen loop van het proces voortdurend in intensiteit toeneemt en ten slotte haar maximum bereikt, welk maximum alsdan niet minder dan 98 %—100 % van het totaal aantal aanwezige bacteriën omvatten kan.

Deze afsterving en de intensiteit van deze afsterving hebben wij afgeleid uit de aantallen afgestorven bacteriën en de steriliteitspercentages op de verschillende tijdstippen en de sterftecijfers in de verschillende perioden van het lysisproces.

3°. De bacteriën vertoonen een *abnorm aspect*. Aanvangende met een geringe zwelling, neemt deze zwelling voortdurend toe; de gezwollen vormen gaan vervolgens over in korrelige vormen, daarna komen de korrels vrij en ten slotte verdwijnen zoowel de korrels als de overblijfselen der bacteriën.

Bij 22° C. zijn de verschillende abnorme vormen nog duidelijker waarneembaar dan bij 37° C.

Deze veranderingen treden eerst op nà den dood der bacteriën, zijn postmortaal, want juist korten tijd (bij 37° C. 30—90 minuten) na de maximale afsterving der bacteriën worden deze abnorme vormen in grootste quantiteit — en ook qualitatief het meest gewijzigd — in het microscopisch beeld aangetroffen. Bovendien verschijnen deze abnorme vormen in alle overgangen van sterk opgezwollen tot microscopisch nauwelijks nog waarneembare, bijna geheel opgeloste bacteriën toe.

4°. De *lysis* komt steeds eenigen tijd (bij 22° C. 3—5 uren, bij 37° C. $1^1/_2$—2 uren, bij 44° C. 1—2 uren) na de maximale afsterving. De afsterving is primair, de lysis secundair; het zijn de afgestorven bacteriën, welke in oplossing overgaan.

Waar de afsterving reeds zeer vroegtijdig begint en een oplossing van afgestorven bacteriën, bv. bij 37° C., reeds in $^1/_2$ uur tot stand kan komen, zullen ook reeds in een vroege phase van het lysisproces afgestorven bacteriën opgelost worden.

5°. De verschillende bacteriën van een SHIGA-bouilloncultuur bezitten een *zeer uiteenloopende gevoeligheid* voor het bacteriophage lysin.

Bij lage begintiters komt geen momentane afsterving tot stand;

bij hoogere begintiters neemt het aantal bacteriën, dat momentaan afsterft, toe, naarmate de begintiter stijgt en bij de allerhoogste begintiters kan somwijlen de momentane afsterving reeds tot een volledige steriliteit voeren.

In vele gevallen blijven bij het lysisproces eenige bacteriën in leven, die dus aan de lysinwerking weerstand hebben geboden, die resistent zijn; zulke resistente bacteriën geven dan aanleiding tot het optreden van secundaire culturen.

De resistente bacteriën vertoonen morphologische en biologische veranderingen; zij zijn meestal lysogeen en produceeren op de agarplaten de zg. „Flatterformen."

De resistente kiemen kunnen reeds van den aanvang af in de culturen aanwezig zijn; bij hoogere concentraties der bacteriën treden de secundaire culturen veelvuldiger op, omdat ook de prae-existeerende, van nature resistente bacteriën in grooter aantal voorhanden zijn.

Naast deze selectie speelt echter de adaptatie ongetwijfeld een zeer groote rol bij het ontstaan van resistente kiemen. Onder allerlei omstandigheden toch, waaronder het lysisproces langzaam verloopt, vertraagd wordt, wordt het ontstaan van resistente bacteriën bevorderd; de SHIGA-bacillen, reeds van nature zoo uiteenloopend gevoelig, kunnen zich alsdan adapteeren aan het lysin. Zoo worden bij lagere begintiters (met een langzamer verloopend lysisproces) veelvuldiger secundaire culturen van resistente bacteriën waargenomen dan bij hoogere. Ditzelfde is het geval, indien het lysisproces plaats vindt bij lagere temperaturen (22° C.) of in gelatine-houdende voedingsmedia (bij 37° C.); en verder, indien het lysisproces vertraagd wordt door de toevoeging van doode SHIGA-bacillen tijdens het lycisproces of door het gebruik van oudere culturen, waarin reeds een groot aantal doode bacteriën aanwezig zijn. Ook bij hoogere concentraties der bacteriën zal naast de selectie een adaptatie als gevolg van de vertraging van het lysisproces voor het ontstaan van de resistente vormen van beteekenis zijn.

Tot nu toe is voor de studie van de bacteriophage lysis in vloeibaar milieu uitsluitend gebruik gemaakt van de cultuur-

telmethode van KOCH; op grond van de uitkomsten, met deze methode verkregen, wordt het lysisproces in *twee* perioden verdeeld:

1. een periode van toeneming van het aantal kweekbare bacteriën, en

2. een periode van vermindering van het aantal kweekbare bacteriën tot het optreden van de lysis.

Door de gelijktijdige toepassing van de microscopische telmethode van KLEIN bij de bestudeering van de bacteriophage lysis in vloeibaar milieu, zijn wij gekomen tot een indeeling van het lysisproces in *drie* perioden, waarvan de natuurlijke afgrenzing door het mechanisme van het proces wordt aangegeven.

Het verloop van de aantallen levende bacteriën tijdens het lysisproces zal de resultante zijn van de vermeerdering en de afsterving der bacteriën op de verschillende tijdstippen van het proces.

Zoolang de vermeerdering der bacteriën de overhand bezit boven de afsterving neemt het aantal levende bacteriën toe (*eerste periode van het lysisproces*).

Is de intensiteit der afsterving zoodanig gestegen, dat in de éénheid van tijd meer bacteriën afsterven dan door deeling ontstaan, dan neemt het aantal levende bacteriën af (*tweede periode van het lysisproces*).

Op de grens van beide perioden is *het maximale aantal levende bacteriën* bereikt, samenvallende met het maximale aantal kweekbare bacteriën.

Gedurende de tweede periode neemt het totale aantal aanwezige bacteriën (levende en doode bacteriën te zamen: het aantal microscopisch telbare bacteriën) nog toe, omdat naast de intensieve afsterving nog steeds een vermeerdering van de overgebleven levende bacteriën tot stand komt. Deze toeneming van het aantal microscopisch telbare bacteriën als gevolg van de vermeerdering der nog in leven zijnde bacteriën is grooter dan uit de aantallen microscopisch telbare bacteriën blijkt, omdat ook afgestorven bacteriën opgelost worden (de aanwezigheid van grootere aantallen abnorme vormen in de tweede periode!).

De toeneming van het aantal microscopisch telbare bacteriën

eindigt, nadat alle levende bacteriën zijn afgestorven en derhalve geen vermeerdering meer tot stand komt: het *maximale aantal microscopisch telbare bacteriën*, dat (op enkele verklaarbare uitzonderingen bij hoogere begintiters na) samenvalt met het maximale aantal afgestorven bacteriën, is bereikt (einde van de tweede periode van het lysisproces).

De gelijktijdig met de snel toenemende afsterving der bacteriën nog steeds plaats vindende vermeerdering der resteerende levende bacteriën is de oorzaak, dat het maximale aantal microscopisch telbare (afgestorven) bacteriën later optreedt dan het maximale aantal levende bacteriën.

Na het bereiken van het maximale aantal microscopisch telbare (afgestorven) bacteriën, begint dit aantal door de voortschrijdende oplossing der afgestorven bacteriën te verminderen *(derde periode van het lysisproces)*, totdat ten slotte miscroscopisch geen bacteriën meer waarneembaar zijn: de lysis is opgetreden (einde van de derde periode).

In de eerste periode van het lysisproces, van het begin van het proces tot het bereiken van het maximale aantal levende bacteriën, is de vermeerdering intensiever dan de afsterving; wij kunnen deze periode daarom noemen *de periode van maximale vermeerdering*.

In de tweede periode, welke eindigt met het bereiken van het maximale aantal microscopisch telbare (afgestorven) bacteriën, is de afsterving intensiever dan de vermeerdering: *periode van maximale afsterving*.

De oplossing der afgestorven bacteriën langs den weg der abnorme vormen vindt voor een zeer gering deel reeds in de eerste periode, meer in de tweede periode en het allermeest na de maximale afsterving in de derde periode plaats (toenemend aantal abnorme vormen!), in welke periode, eindigende met de lysis, geen vermeerdering en ook geen afsterving van bacteriën optreedt: *periode van maximale oplossing*.

Afwijkingen van dit verloop komen voor bij *hoogere begintiters*. Naarmate de begintiter hooger wordt genomen, naar die mate

begint de afsterving vroeger en is de afsterving intensiever. Bij hooge initiaaltiters heeft zelfs reeds onmiddellijk na de toevoeging van het bacteriophage lysin een afsterving plaats: momentane afsterving; deze momentane afsterving is des te sterker, naarmate de begintiter van het lysin verhoogd wordt.

De vervroegde en versterkte afsterving bij stijging van de begintiter van het lysin is oorzaak, dat de tijd, gedurende welken de bacteriën zich vermeerderen, korter wordt. De eerste periode duurt minder lang en het maximale aantal levende bacteriën wordt relatief kleiner, naarmate de begintiter hooger is genomen. Ook de tweede periode wordt van geringeren duur en het einde van deze en dat van de eerste periode komen bij stijging van de begintiter steeds dichter bij elkander te liggen (Tabel XXI) en vallen ten slotte samen. Waar dit laatste geschiedt (Tabellen XIX en IL; Tabel XXXI, met lage begintiter, laten wij hier buiten beschouwing wegens de bijzonder hooge bacteriëele concentratie in dit experiment) en derhalve maximaal aantal levende en maximaal aantal microscopisch telbare bacteriën te gelijker tijd optreden (het maximale aantal afgestorven bacteriën komt in deze gevallen uit den aard der zaak later dan het maximale aantal microscopisch telbare bacteriën), zoodat een tweede periode ontbreekt, heeft alleen in de eerste periode vermeerdering van bacteriën plaats, welke vermeerdering in intensiteit de afsterving overtreft, zoodat een toeneming van het aantal levende bacteriën tot stand komt. Op deze eerste periode volgt dan onmiddellijk de derde (in deze gevallen de tweede) periode van oplossing der afgestorven bacteriën op groote schaal, totdat de lysis is ingetreden; alleen komt in deze derde periode tevens een snel voortschrijdende afsterving der levende bacteriën tot stand.

En eindelijk wordt ook de derde periode van korteren duur bij verhooging van de begintiter van het lysin, omdat reeds in de voorgaande perioden een vermeerderde oplossing van afgestorven bacteriën heeft plaats gevonden.

Door de vervroegde en versterkte afsterving kan bij hoogere initiaaltiters van het lysin reeds van den aanvang van het proces af de afsterving de overhand bezttten boven de vermeerdering,

zoodat geen toeneming, maar direct een daling van het aantal levende bacteriën geconstateerd kan worden; de eerste periode van het lysisproces ontbreekt. Het lysisproces begint met de tweede periode: vermindering van het aantal levende bacteriën, toeneming van het aantal microscopisch telbare bacteriën; de tweede periode wordt gevolgd door de periode van maximale oplossing (Tabellen LII en LVI).

Bij de hoogste begintiters van het lysin volgt op de meestal zeer intensieve momentane afsterving een periode, waarin geen vermeerdering, maar uitsluitend een voortschrijdende afsterving van bacteriën optreedt (Tabellen XX, LIII en LVII). Het aantal levende bacteriën daalt onmiddellijk, maar ook het aantal microscopisch telbare bacteriën neemt direct af door de oplossing der afgestorven bacteriën. Abnorme vormen zijn zeer spoedig in grooten getale aanwezig en reeds na een korten tijd, in Tabel XX o.a. reeds $^1/_2$ uur na het begin van het proces, zijn duizenden afgestorven bacteriën in oplossing overgegaan. De eerste en tweede periode ontbreken; het proces begint onmiddellijk met de derde periode, alleen met dit verschil, dat in deze periode nog gedurende eenigen tijd levende bacteriën voorhanden zijn, welke echter in een snel tempo afsterven.

Hoe hooger de begintiter van het lysin wordt genomen, des te korter duurt derhalve ook het geheele lysisproces. Nog duidelijker dan in onze proefnemingen met kolven komt zulks voor den dag in de buisjes volgens APPELMANS met stijgende begintiters, omdat in de buisjes van ieder experiment steeds ook dezelfde concentratie van bacteriën aanwezig was (Tabellen XXII, XXIII, XXIV en XXV).

Behalve de hoogte van de begintiter oefenen nog verschillende andere factoren invloed uit op den *duur van het lysisproces.*

1. *Toevoeging van levende of doode* SHIGA-*bacillen, concentratie der bacteriën en ouderdom der culturen.*

Door tijdens het lysisproces levende of doode SHIGA-bacillen (door verwarming gedood of uit oude culturen afkomstig) toe te voegen, wordt het lysisproces vertraagd, door de doode bacteriën

meer dan door de levende. De toegevoegde levende bacteriën worden vroeger opgelost dan de van den aanvang af aanwezige bacteriën, hetgeen verklaard kan worden uit de hoogere begintiter, waarmede de toegevoegde bacteriën het lysisproces aanvangen.

De vertraging van het lysisproces door doode SHIGA-bacillen is voornamelijk toe te schrijven aan de adsorptie van lysin, zooals door centrifugeerproeven aangetoond werd; doode heterologe bacteriën adsorbeeren geen lysin.

Door toevoeging van levende bacteriën wordt de concentratie der bacteriën hooger en bij hoogere concentraties duurt het lysisproces langer; bij zeer hooge concentraties komt slechts een partiëele lysis tot stand, omdat bij die hooge concentraties secundaire culturen van resistente kiemen ontstaan. Er bestaat een bepaalde maximale concentratie van bacteriën, waarbij het lysisproces nog optimaal tot stand komt.

Oudere SHIGA-bouillonculturen (48-urige, 72-urige, enz.) geven slechts een partiëele lysis, omdat de doode bacteriën niet opgelost worden. Met den ouderdom der cultuur neemt het aantal doode bacteriën toe en blijft dus een grootere troebelheid resteeren. De partiëele lysis komt wegens het adsorbeeren van lysin door de doode bacteriën later tot stand.

2. *De temperatuur, waarbij het lysisproces verloopt.*

Hoe hooger de temperatuur is, waarbij het lysisproces plaats vindt, des te korter worden de verschillende perioden, des te sneller verloopt het geheele lysisproces.

Bij onze proefnemingen met kolven nam het geheele lysisproces (van hoogste tot laagste begintiter) bij 22° C. een tijd in beslag van 5—10 uren, bij 37° C. van 1 tot 6 uren en bij 44° C. van 2 tot 5 uren.

Veel duidelijker nog komen deze verschillen voor den dag in de buisjes volgens APPELMANS met stijgende begintiters, omdat in deze buisjes tevens een zelfde concentratie van bacteriën aanwezig was (Tabellen LVIII en LIX).

Bij 45° C. komt geen vermeerdering van SHIGA-bacillen meer tot stand.

Opmerking verdient nog, dat het afstervingsproces in de eerste

periode bij 37° C. schijnbaar onregelmatiger verloopt dan bij 22° C. In eenige proefnemingen bij 37° C. (Tabellen XII, XVI, XVII en XIX) ziet men de aantallen afgestorven bacteriën en de steriliteitspercentages op een bepaald tijdstip van de eerste periode dalen, om later weder te stijgen; iets dergelijks wordt bij 22° C. niet waargenomen. De oorzaak van dit verschil is hierin gelegen, dat bij 37° C. de oplossing der afgestorven bacteriën veel sneller tot stand komt dan bij 22° C. (bij 37° C. duurt de periode van maximale oplossing $1^1/_2$—2 uren, bij 22° C. 3—5 uren); hierdoor kunnen de aantallen microscopisch telbare bacteriën zoodanig verminderd worden, dat de gevonden verhoudingen tot stand komen.

3. *Toevoeging van gelatine en agar-agar.*

Toevoeging van gelatine werkt remmend op het lysisproces, ofschoon gebleken is uit onze proefnemingen, dat bij hooge begintiters in vloeibare voedingsgelatine bij 37° C. nog wel volledige lysis plaats kan vinden; het lysisproces neemt echter gewoonlijk meer tijd in beslag. Bij lagere begintiters komt geen lysis tot stand.

Opmerkelijk is het snel en constant optreden van secundaire culturen.

In de agarplaten kan evenals in de gelatine-platen het lysisproces niet meer optreden, tenzij grootere hoeveelheden lysin in de platen worden overgebracht. Bij de bepaling van de aantallen levende bacteriën in lysin-houdende bouillonculturen door middel van de kweek-telmethode met agarplaten is ons toch in vergelijkende proefnemingen (Tabellen I, II en III) gebleken, dat $^1/_{10}$ c.c. van de lysin-houdende cultuurvloeistof relatief veel minder koloniën op de agarplaten deed ontstaan dan de veel (ongeveer 100-voudig) kleinere hoeveelheid, vervat in een platina-lus. Het is derhalve een goede voorzorgsmaatregel, om zoo weinig mogelijk lysin in de platen over te voeren, vooral natuurlijk, indien een lysin met hooge titer in de cultuurvloeistof aanwezig is.

In dit verband doet zich de vraag voor, of de bij hooge begintiters optredende zg. „momentane" afsterving van SHIGA-bacillen misschien toch niet momentaan is, niet plaats vindt in de lysin-houdende cultuurvloeistof, maar eerst later tot stand komt in de

agarplaten als gevolg van de doorwerking van het in die platen overgebrachte lysin. De microscopische telmethode leert hier den juisten toestand kennen en toont aan, dat inderdaad een momentane afsterving in de lysin-houdende cultuurvloeistof aangenomen dient te worden. Bij de hoogste begintiters toch zijn reeds korten tijd na het begin van het proces een zeer groot aantal bacteriën in oplossing overgegaan; bij 37° C. reeds na $^1/_2$ uur (Tabel XX: daling van het aantal microscopisch telbare bacteriën van 12832 op 7383), bij 44° C. na 1 uur (Tabel LVII: daling van 9492 op 2637) en bij 22° C. na 2 uren (Tabel LIII: daling van 7735 op 4921). Bovendien zij er nog op gewezen, dat op deze tijdstippen bijna alle aanwezige bacteriën reeds in abnorme vormen zijn veranderd.

In een SHIGA-bouilloncultuur met bacteriophaag lysin treedt de *troebelheid* vroeger op, resp. wordt vroeger intensiever, dan in een zelfde cultuur zonder bacteriophaag lysin (snellere vermeerdering!)

In de eerste en tweede periode van het lysisproces neemt de troebelheid regelmatig in intensiteit toe; in deze beide perioden wordt ook het totale aantal aanwezige (microscopisch telbare) bacteriën voortdurend grooter. Maar ook in de derde periode blijft bijna steeds nog eenigen tijd (bij 37° C. 30—60 minuten) dezelfde intensiteit van troebelheid bestaan of neemt de troebelheid zelfs nog toe, zoodat in deze periode de maximale troebelheid bereikt wordt, niettegenstaande het aantal microscopisch telbare (afgestorven) bacteriën reeds belangrijk gedaald is. De verklaring is te vinden in de veranderingen, welke de afgestorven bacteriën vóór de oplossing ondergaan. Na de maximale afsterving zijn de abnorme vormen in bijzonder groote aantallen aanwezig en heeft de opzwelling der bacteriën haar grootste hoogte bereikt: het zijn deze abnorme vormen, welke door hun sterke zwelling de troebelheid van de cultuurvloeistof aanzienlijk verhoogen. Daar reeds tegen het einde der eerste periode dergelijke abnorme vormen beginnen op te treden, om in den verderen loop van het lysisproces in aantal toe te nemen, zal ook de intensiteit der troebelheid in de beide eerste perioden voor een kleiner of grooter deel

aan de aanwezigheid van deze abnorme vormen toegeschreven moeten worden. De intensiteit der troebelheid wordt derhalve niet alléén bepaald door het totale aantal aanwezige (microscopisch telbare) bacteriën; zij kan geen juiste maatstaf zijn voor de beoordeeling van het lysisproces.

Na het bereiken van de maximale troebelheid nemen de microscopisch telbare (afgestorven) bacteriën zeer snel in aantal af; langs den weg der abnorme vormen gaan zij in oplossing over en wordt de cultuurvloeistof volkomen helder (lysis).

Bij zeer hooge begintiters, waarbij geen vermeerdering van bacteriën meer tot stand komt, treedt tijdens het lysisproces ook geen troebelheid van de cultuurvloeistof op, resp. wordt de troebelheid niet intensiever, maar neemt integendeel in intensiteit af.

Het verloop van de bacteriënbevolking tijdens het lysisproces *verschilt* in hooge mate van dat in een SHIGA-bouilloncultuur zonder bacteriophaag lysin.

In een SHIGA-bouilloncultuur zonder bacteriophaag lysin is vooreerst de vermeerdering der bacteriën, zoowel bij 22° C. als bij 37° C., minder intensief (langere generatieduur); treedt in de tweede plaats, noch bij 22° C., noch bij 37° C., in de eerste 24 uren een afsterving van bacteriën op; en neemt ten derde de troebelheid der cultuurvloeistof in de eerste 24 uren, zoowel bij 22° C. als bij 37° C., regelmatig toe met het aantal aanwezige levende bacteriën.

* * *

Met het eigenaardige verloop van de bacteriënbevolking tijdens het lysisproces — vermeerdering van bacteriën, afsterving van bacteriën en oplossing van afgestorven bacteriën — gaat nog een 4e verandering gepaard, nl. ***de vermeerdering van de hoeveelheid bacteriophaag lysin,*** blijkende uit de titerstijging van het lysin.

In den aanvang van het lysisproces komt veelal een vermindering van de hoeveelheid toegevoegd lysin, een titerdaling, tot stand, welke hieraan moet worden toegeschreven, dat lysin door de bacteriën geadsorbeerd wordt.

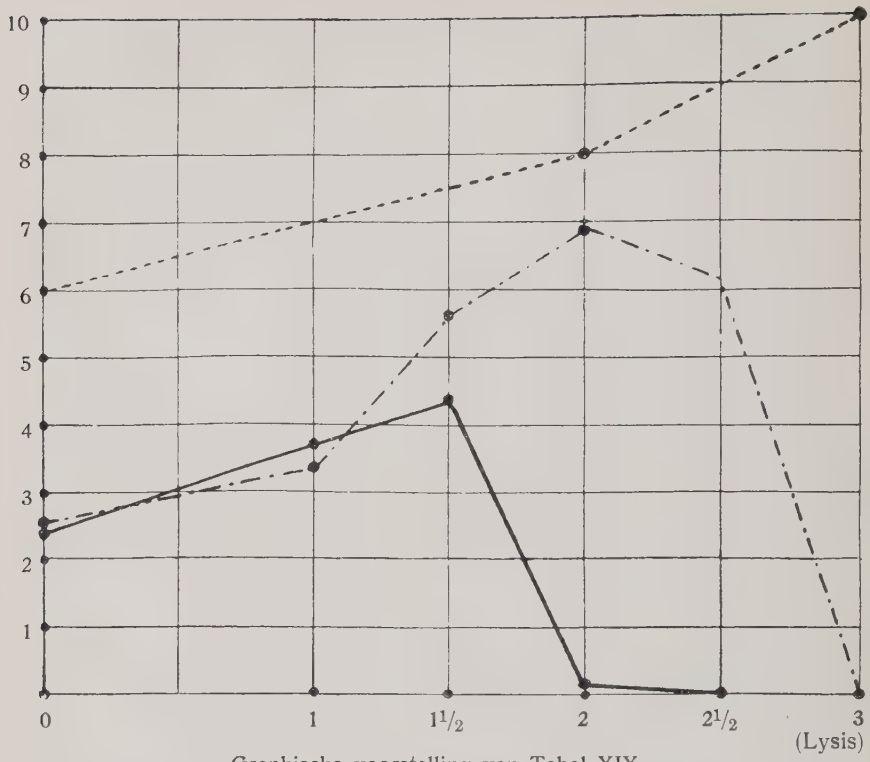
Na de titerdaling treedt een terugkeer tot de begintiter op en vervolgens vindt, met uitzondering alleen van de lysisprocessen met de hoogste begintiters, een toeneming van de hoeveelheid lysin, een titerstijging, plaats.

Deze titerstijging neemt een aanvang in de eerste periode, *eenigen tijd nadat de vermeerdering der bacteriën is begonnen.* De titer stijgt vervolgens regelmatig, zoowel in de eerste als in de tweede periode van het lysisproces. Maar ook in de derde periode, waarin elke vermeerdering van bacteriën geëindigd is en *uitsluitend een oplossing van afgestorven bacteriën* tot stand komt, neemt de hoeveelheid lysin toe, stijgt de lysin-titer, niet zelden zelfs zeer aanzienlijk, om met de lysis (in sommige experimenten bij 37° C. ook na de lysis) maximaal te worden, de eindtiter te bereiken.

De graphische voorstellingen van de Tabellen XIX, LII en LV geven de verhoudingen van de aantallen levende en aantallen afgestorven bacteriën ten opzichte van de lysin-productie tijdens het lysisproces, bij verschillende temperaturen verloopende, duidelijk weer. (Zie pag. 134, 135 en 136.)

De lysin-titer blijft stijgende nà de daling van het aantal levende bacteriën en ook nà de daling van het aantal afgestorven bacteriën; de titer vertoont in deze experimenten in de periode van maximale oplossing zelfs *een meer sprongsgewijze verhefting.* De lysin-productie loopt niet parallel met de aantallen levende bacteriën, evenmin met de aantallen afgestorven bacteriën, maar de lysin-productie loopt evenwijdig met de *aantallen* (afgestorven en daarna) *opgeloste bacteriën.* Het bacteriophage lysin kan derhalve niet opgevat worden als een tijdens het leven der bacteriën uitgescheiden stofwisselingsproduct, noch als een andere gelijktijdig en direct met de vermeerdering der bacteriën samenhangende factor, maar het lysin komt vrij uit de afgestorven bacteriën, nadat deze uiteengevallen en opgelost zijn.

In overeenstemming hiermede zijn de resultaten van onze filtratieproeven; filtratie door kaarsen van CHAMBERLAND-PASTEUR in dat stadium van het lysisproces (derde periode), waarin een groot aantal opgezwollen en korrelige vormen (postmortaal ver-



Graphische voorstelling van Tabel XIX.

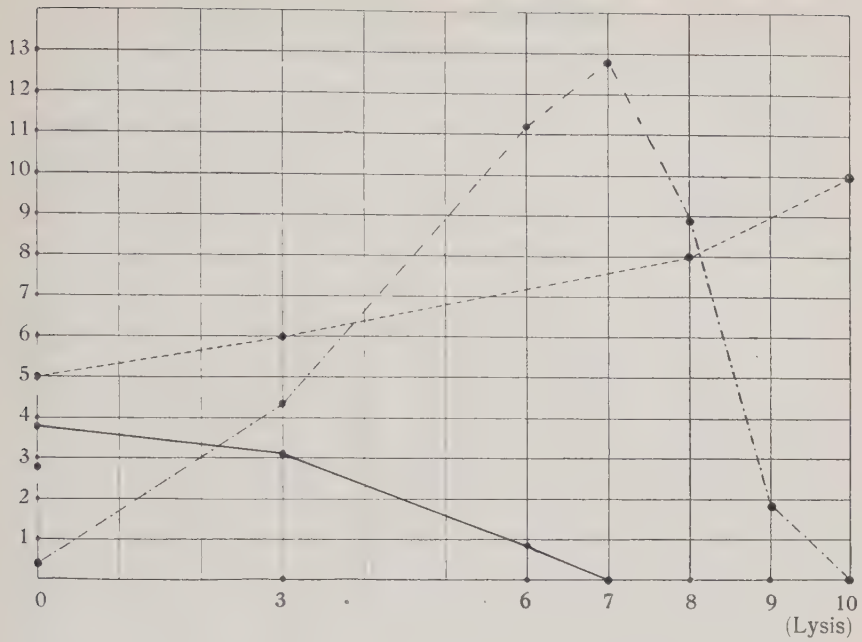
- - - - - - - lysin-titer.
——— levende bacteriën.
—·—·— doode bacteriën.

De cijfers op de horizontale lijn beteekenen uren; de cijfers op de verticale lijn beteekenen duizendtallen levende en doode bacteriën en lysineenheden.

anderde afgestorven bacteriën op weg naar de oplossing) aanwezig zijn, geeft aanleiding tot een somwijlen zelfs aanzienlijke titerdaling (Tabellen XXXXI en XXXXII).

In onze proefnemingen met de hoogste initiaaltiters (Tabellen XX, LIII en LVII) wordt de momentane afsterving gevolgd door een voortschrijdende afsterving der bacteriën, terwijl iedere bacteriëele vermeerdering achterwege blijft; onder den invloed van het bacteriophage lysin worden de bacteriën gedood en opgelost, maar er treedt geen vermeerdering van de hoeveelheid lysin op.

Alleen die bacteriën derhalve, welke tijdens het lysisproces geboren worden, voeren na afsterving en oplossing tot een toeneming van de hoeveelheid lysin.



Graphische voorstelling van Tabel LII.

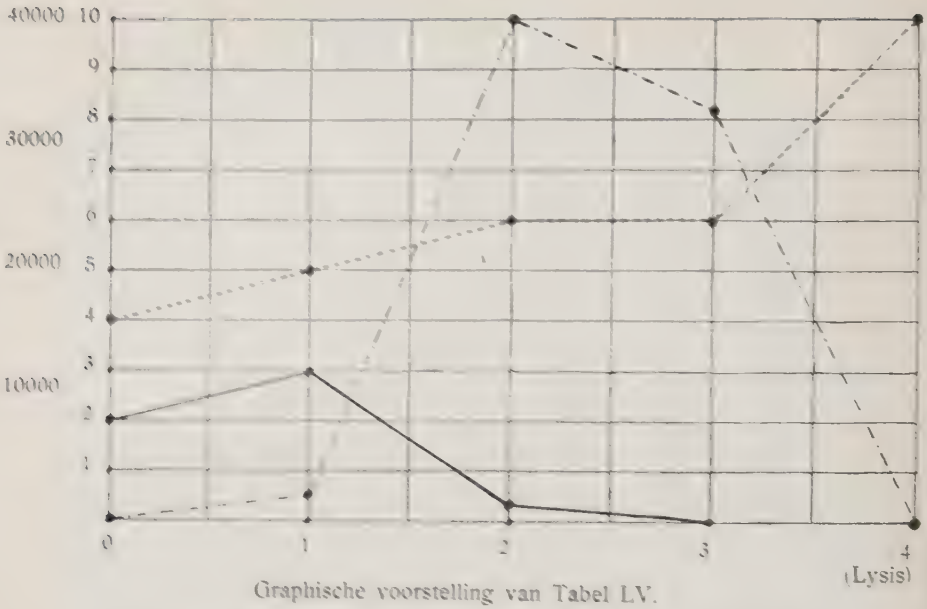
- - - - - - - lysin-titer.
——— levende bacteriën.
—·—·—· doode bacteriën.

De cijfers op de horizontale lijn beteekenen uren; de cijfers op de verticale lijn beteekenen duizendtallen levende en doode bacteriën en lysineenheden.

Het *aantal* bacteriën, dat tijdens het lysisproces geboren wordt en de lysin-productie bepaalt, *is afhankelijk van de vermeerdering der bacteriën* in den loop van het proces. Hoe intensiever deze vermeerdering tot stand komt en hoe langer zij duurt, des te sneller geschiedt ook de lysin-productie en des te meer lysin wordt er geproduceerd.

Bij 37° C. verloopt de vermeerdering der bacteriën sneller dan bij 22° C.; ook de lysinstijging geschiedt bij 37° C. in een korteren tijd dan bij 22° C.

Bij een lagere initiaaltiter is de duur der periode, gedurende welke de vermeerdering der bacteriën plaats vindt, langer en het maximum aantal levende bacteriën, dat bereikt wordt, relatief grooter dan bij een hoogere begintiter; bij een lagere begintiter wordt ook een grootere quantiteit lysin gevormd.



Graphische voorstelling van Tabel LV.

- - - - - - lysin-titer.
———— levende bacteriën.
—·—·— doode bacteriën.

De cijfers van de horizontale lijn beteekenen uren; de cijfers van de verticale lijn beteekenen (in eenheden) lysineenheden en (per 2½ eenheid) tienduizendtallen levende en doode bacteriën.

Onafhankelijk van de begintiter wordt in onze experimenten een zelfde *maximale eindtiter* bereikt; deze maximale eindtiter bedraagt gewoonlijk 10.

Alleen de lysisprocessen met de hoogste begintiters, titers van 8-9, maken hierop een uitzondering; bij deze lysisprocessen komt geen vermeerdering van bacteriën tot stand en blijft de eindtiter 8-9 bedragen.

Bij de lysisprocessen met lagere begintiters kan de maximale afsterving reeds optreden bij lysin-titers, welke, als begintiters toegevoegd, nog tot geen waarneembare momentane afsterving aanleiding geven. Terwijl bij de hoogste begintiters, titers van 8-9, een momentane afsterving tot steriliteitspercentages van 92 bereikt wordt (Tabellen XX en LIII), ziet men o.a. in de proefnemingen XIII, XIV en L., met lagere begintiters, de maximale afsterving met steriliteitspercentages van 99-100 reeds bij lysin-

titers van 5-6 tot stand komen. *De maximale afsterving tijdens het lysisproces wordt derhalve zeer zeker niet alléén teweeggebracht door de hoogte van de bereikte lysin-titer.* Op het oogenblik van de maximale afsterving zijn een groot aantal (tijdens het lysisproces geboren) afgestorven bacteriën aanwezig, welke als het ware lysin-in-aanmaak voorstellen. Nadat deze afgestorven bacteriën langs den weg van opzwelling, korreling, enz. in oplossing zijn overgegaan, komt het daarin aanwezige lysin vrij, dat, gevoegd bij het reeds voorhanden lysin, de eindtiter 10 geeft.

De lysin-productie en de lysis treden zoowel bij aan- als afwezigheid van zuurstof op.

In een milieu zonder voedingsstoffen, in physiologische keukenzout-solutie, waarin geen vermeerdering van SHIGA-bacillen kan optreden, werkt het bacteriophage lysin niet in op de levende SHIGA-bacillen: geen lysin-productie, geen lysis, geen resistente bacteriën.

Centrifugeering van den lysaatbouillon gedurende $^1/_2$ uur (4800 touren per minuut), geeft tot geen daling van de lysin-titer in de bovenste lagen van de vloeistof aanleiding.

Een verwarming, gedurende $^1/_2$ uur bij 58° C., voorafgaande aan de titratie, in verschillende stadia van het lysisproces verricht, voert niet tot een verhooging, maar tot een verlaging van de titer.

Evenmin is een filtratie door kaarsen, voorafgaande aan de titerbepaling, aan te bevelen.

* * *

De ***inwerking*** van het bacteriophage lysin op de SHIGA-bacillen in het kort samenvattend, komen wij tot het volgende schema:

1. *Groote* hoeveelheden lysin (hoogere begintiters) werken *momentaan doodend* op de SHIGA-bacillen. Naarmate de hoeveelheid lysin grooter is, wordt ook een grootere fractie van SHIGA-bacillen momentaan gedood. Op de overlevende SHIGA-bacillen heeft dezelfde inwerking plaats als onder den invloed van kleinere hoeveelheden lysin tot stand komt.

2. *Kleine* hoeveelheden lysin (lagere begintiters) maken de SHIGA-bacillen *ziek*. Deze ziekte openbaart zich:

a. door een *versnelde vermeerdering*, en

b. door een *spoedig afsterven* van de zieke SHIGA-bacillen.

3. *Karakteristieke postmortale veranderingen* van *alle* door het lysin gedoode SHIGA-bacillen.

4. *Snelle en volledige oplossing* van *alle* door het lysin gedoode SHIGA-bacillen.

SHIGA-bacillen, op andere wijze gedood (niet door het lysin), worden niet opgelost.

5. *Lysinvermeerdering* door oplossing van de tijdens het lysisproces geboren (zieke) en daarna afgestorven SHIGA-bacillen.

6. *Groot verschil in gevoeligheid* der SHIGA-bacillen van een zelfde cultuur en *bijzonder groot adaptatievermogen* van de SHIGA-bacillen tegenover het bacteriophage lysin (*Resistente* bacillen).

LITERATUURLIJST.

1. F. D'HERELLE: Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. C. R. de l'Acad. d. Sciences **165**, 373, 1917.
2. F. D'HERELLE: Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (Bacteriophagum intestinale). C. R. d. l. Soc. de Biol. **81**, 1160, 1918.
3. F. D'HERELLE: Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysenterie bacillaire. C. R. d. l'Acad. des Sciences **167**, 170, 1918.
4. F. D'HERELLE: Sur le microbe bactériophage. C. R. d. l. Soc. de Biol. **82**, 1237, 1919.
5. F. D'HERELLE: Sur la culture du microbe bactériophage. C. R. d. l. Soc. de Biol. **83**, 52, 1920.
6. F. D'HERELLE: — Le Bactériophage, son rôle dans l'immunité. Edit. Masson et Cie, Paris 1921.
   — Der Bakteriophage und seine Bedeutung für die Immunität. Übersetz. von Preimbter, Sell und Pistorius. Braunschweig 1922.
   — The Bacteriophage, its role in Immunity, Traduction G. Smith. Baltimore 1922.
7. F. D'HERELLE: Sur la nature du Bactériophage. C. R. d. l. Soc. de Biol. **84**, 339, 1921.
8. R. DEBRÉ et HAGUENAU: Quelques particularités du phenomène de D'HERELLE. C. R. d. l. Soc. de Biol. **83**, 1348, 1920.
9. J. BORDET et M. CIUCA: Sur la régéneration du principe actif dans l'autolyse microbienne transmissible. C. R. d. l. Soc. de Biol. **85**, 1095, 1921.
10. W. SEIFFERT: Das D'HERELLE'sche Phänomen als „Exogene autolyse" der Bakteriën. Zeitsch. f. Hyg. u. Inf. krankh. **98**, 482, 1922.
11. W. SEIFFERT: Das D'HERELLE'sche Phänomen. Med. Klinik, No. 31, 34, 35. 1922.
12. W. SEIFFERT: Ein Beitrag zur Variation der Bakteriën und zum D'HERELLE'sche Phänomen. Centralbl. f. Bakt. (or.) **39**, 195, 1922.
13. W. SEIFFERT: Der Charakter des D'HERELLE'schen Phänomens. Zeitsch. f. Immf. **38**, 292, 1923.
14. W. SEIFFERT: Neue Untersuchungen über den Charakter des D'HERELLE'schen Phänomens. Med. Klinik. **19**, 833, 1923.

15. W. Seiffert: Der Charakter des d'Herelle'schen Phänomens. Klin. Woch. **2**, 1049, 1923.
16. R. Doerr und W. Grüninger: Studiën zum Bakteriophagenproblem I. Zeitliche und quantitatieve Beziehungen zwischen Bakteriënvermehrung und Zunahme des lytischen Agens. Zeitsch. f. Hyg. **97**, 209, 1922.
17. R. Doerr: Die Bakteriophagie. **1**, 1489 en 1537, 1922.
18. R. Doerr: Über Bakteriophagen. Schweiz. Med. Woch. **53**, 1009, 1923.
19. H. Meuli: Studien zum Bakteriophagenproblem II. Die Konzentration des lytischen Prinzips und ihre Beziehungen zum Ablauf der Bakteriophagenreaktion. Zeitsch. f. Hyg. **99**, 46, 1923.
20. R. Doerr und Berger: Studiën zum Bakteriophagenproblem III. Zeitsch. f. Hyg. **97**, 422, 1922.
21. E. Schiedegger: Studien zum Bakteriophagenproblem IV. Der Einflusz der Wasserstofionenkonzentration auf das lytischen Agens und den Ablauf der übertragbaren Bakteriolyse Zeitsch. f. Hyg. **99**, 403, 1923.
22. R. Doerr und Zdansky: Studiën zum Bacteriophagenproblem V. Zeitsch. f. Hyg. **100**, 79, 1923.
23. C. Schuurman: De bacteriophaag, een ultramicrobe. Leiden 1925.
24. K. von Angerer: Über Bakteriophagie. Klin. Woch. **2**, 1194, 1923.
25. K. von Angerer: Beiträge zum Bakteriophagenproblem. Archiv. f. Hyg. **92**, 312, 1924.
26. A. Gratia: L'autolyse transmissible du Staphylocoque et l'action coagulante des cultures filtrées. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **85**, 25, 1921.
27. J. de Necker: Au sujet de l'action inhibitive du principe bactériophage sur le dévelloppement des microbes receptifs. C. B. d. l. Soc. d. Biol. **85**, 742, 1921.
28. Torahiko Ikoma: Studiën über Bakteriophagenwirkung. Centralbl. f. Bakt. **91**, 554, 1924.
29. A. Seiser: Untersuchungen über das Phänomen von d'Herelle. Archiv. f. Hyg. **92**, 189, 1923.
30. E. Wollman: Recherches sur la Bactériophagie. Annales de l'Institut Pasteur no. 10, 1925.
31. A. Klein: Eine einfache Methode zur Sporenfärbung. Centralbl. f. Bakt. **25**, 376, 1899.
32. A. Klein: Eine neue microscopische Zählungsmethode der Bakteriën. Centralbl. f. Bakt. **27**, 834, 1900.
33. J. Idzerda: Onderzoekingen over de beteekenis van de darmbacteriën voor het dierlijk organisme. Diss. Groningen 1919.
34. F. Hehewerth: Die microsc. Zählungsmethode der Bakteriën von A. Klein und einige Anwendungen derselben. Archiv. f. Hyg. **39**, 320, 1901.

De microsc. telmethode der Bacteriën door A Klein. Diss. Amsterdam 1900.
35. A. Klein: Die physiologische Bakteriologie des Darmkanals. Archiv. f. Hyg. **45**, 117, 1902.
36. A. Klein: Über die Bakteriënmenge in menschlichen Fäces. Zeitsch. f. Klin. Med. **48**, 163, 1903.
37. A. Klein und F. Visser: Über die Methoden zur Bestimmung der Bakteriënmenge menschlicher Fäces. Folia microbiologica **2**, 201, 1914.
38. A. Klein: Bacteriologische onderzoekingen van menschelijke faeces. Verslagen van Kon. Acad. v. Wetensch. Amsterdam **10**, 57, 1901. Proceedings **4**, 65, 1901.
39. Kolle und Wassermann: Handbuch der Pathogene Mikro-organismen, 2e Aufl., **1**, 483, 1912.
40. Rubner, v. Gruber und Ficher: Handbuch der Hygiene **3**, 188, 1913.
41. A. Klein: Über die Dosierung der Schutzimpfstoffe. Berl. Klin. Woch. **45**, 122, 1902.
42. A. Klein: De bacteriologische veranderingen in het darmkanaal van het konijn. Verslagen van Kon. Acad. v. Wetensch. Amsterdam **10**, 584, 1902 en Proceedings **4**, 477, 1902.
43. H. v. Preisz: Die Bakteriophagie. Uitg. te Budapest 1925.
44. C. v. Prausnitz: Untersuchungen über den d'Herelle'schen Bakteriophagen. Centralbl. f. Bakt. **89**, 187, 1923.
45. E. Zdansky: Kritische und experimentelle Beiträge zur Frage der Wirkungsmöglichkeit der Bakteriophagen im Warmblüterorganismus und in der freien Natur. Zeitsch. f. Hyg. **103**, 164, 1924.
46. G. Eliava et E. Pozerski: Sur les caractères nouveaux presentés par le Bacille de Shiga ayant resisté à l'action du Bactériophage de d'Herelle. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **84**, 708, 1921.
47. O. Bail: Bakteriophage Wirkungen gegen Flexner- und Colibakterien. Wien. Klin. Woch. p. 448, 1921.
48. A. Gratia: De l'adaptation héréditaire du Colibacille à l'autolyse microbienne transmissible. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **84**, 750, 1921.
49. A. Gratia: Dissociation d'une souche de Colibacille en deux types d'individus de propriétés et virulences différentes. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **84**, 751, 1921.
50. A. Gratia: Autolyse transmissible et variations microbiennes. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **85**, 251, 1921.
51. A. Gratia: Studies on the d'Herelle-phenomenon. Journ. of Exp. Med. **34**, 115, 1921.
52. A. Gratia: The Twort-d'Herelle phenomenon. Journ. of Exp. Med. **35**, 287, 1922.

53. J. Arkwight: The Source and characteristics of certain cultures sensitive to Bacteriophage. The Brit. Journ. of Exp. Path. **5**, 1, 1924.
54. Ann Kuttner: Bacteriophage Phenomena. Journ. of Bact. (Baltimore) **8**, 49—103, 1923.
55. R. Bruynoghe et J. Maisin: Au sujet des microbes devenus resistants du principe bactériophage. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **84**, 847, 1921.
56. J. Bordet et M. Ciuca: Evolution des cultures de Coli lysogènes. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **84**, 847, 1921.
57. G. Izar: Sui considetti batteriofagi (zie no. 61). Ac Goemia di Scienze naturali. 1921.
58. P. Brutsaert: Les bactériophages et les microbes dans le bouillon hypersalé. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **90**, 646, 1924.
59. P. Brutsaert: Bacteriophage studies te Leuven 1923/1924.
60. Otto, Munter und Winkler: Beiträge zum d'Herelle'schen Phänomen. Zeitsch. f. Hyg. **96**, 118, 1922.
61. Otto und Munter: Bakteriophagie. Ergebn. der Hyg., Bakt., Immf. und Exp. Ther. VI, 1923.
62. D. Gildemeister: Über Variabilitätserscheinungen bei Bakteriën. Centralbl. f. Bakt. **79**. 1917.
63. D. Gildemeister: Über das d'Herelle'sche Phänomen. Berl. klin. Woch. **58**, 1355, 1921.
64. D. Gildemeister: Weitere Untersuchungen über das d'Herelle'sche Phänomen. Centralbl. f. Bakt. **89**, 181, 1922 (suppl.).
65. W. C. Davison: d'Herelle phenomenon. Journ. of Bact. **7**, 475, 1922.
66. W. C. Davison: Filtrable substance antagonistic to Dysentery and other organisms. Abstracts of Bacteriology 1922.
67. F. Twort: An investigation on the Nature of Ultramicroscopic Viruses. The Lancet. Dec. 1915.
68. A. Gratia: Preliminary report on a Staphylococcus Bacteriophage. Proc. Soc. f. exp. Biol. a. Med. **18**, 217, 1921.
69. A. Gratia: The Twort-d'Herelle phenomenon. Journ. of Exp. Med. **35**, 287, 1922.
70. A. Gratia: La lyse transmissible du Staphylocoque. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **86**, 276, 1922.
71. F. d'Herelle: Sur la résistance des bactéries à l'action du bactériophage. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **83**, 97, 1920.
72. F. d'Herelle: Phenomènes coïncidant avec l'acquisition de la résistance des Bactéries à l'action du microbe bactériophage. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **84**, 382, 1921.
73. J. Bordet et M. Ciuca: Antolyse microbienne et sérum antilytique. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **84**, 280, 1921.
74. J. Bordet et M. Ciuca: Guérison et retour à l'état primitif par le

sérum antilytique du coli lysogène. C. R. d. l. Soc. de Biol. **84**, 748, 1921.

75. H. Bergstrand: Sur la lyse microbienne transmissible. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **86**, 489, 1922.
76. H. Bergstrand: Sur la variation des bactéries. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **86**. 492, 1922.
77. R. Appelmans: Le Bactériophage dans l'organisme. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **85**, 722, 1921.
78. R. Appelmans: Le dosage du Bactériophage. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **85**, 1098, 1921.
79. R. Appelmans: Quelques applications de la methode de dosage du Bactériophage. C, R. d. l. Soc. d. Biol. **86**, 508, 1922.
80. A. Pondman: Proeven tot het verkrijgen van het verschijnsel van d'Herelle uit reinculturen van bacteriën. Diss. Leiden 1923.
81. P. Flu: Een methode voor het onderzoek van reincultures op besmetting met een bacteriophaag. Tijdschr. v. Vergel. Path. X, afl. 2—3, 1923.
82. P. Flu: Vorming van bacteriophagen in oude bouillonculturen van pathogene darmbacteriën en de natuur van den bacteriophaag. Tijdschr. v. Geneesk. II, 226, 1923.
83. A. Botez: La bactériolyse en séries par le violet de méthyle. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **84**, 585, 1921.
84. M. Lisbonne et L. Carrère: Antagonisme microbien et lyse transmissible du bacille de Shiga. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **86**, 569, 1922.
85. M. Lisbonne et L. Carrère: Sur l'obtention bactériophage par antagonisme microbien. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **87**, 1011, 1922.
86. Lisbonne et Carrère: Obtention du principe lytique pour le Bac. de Shiga par cultures filtrées de B. Coli. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **88**, 724, 1923.
87. Weinberg et Aznar: Autobactériolysines et le phenomène de d'Herelle. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **86**, 833, 1922.
88. Weinberg et Aznar: Quelques faits nouveaux sur les autobactériolysines. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **87**, 136, 1923.
89. C. Pico: Sur la nature du principe bactériophage de Twort-d'Herelle. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **86**, 886, 1922.
90. C. Pico: Le principe lytique est-il contenu dans les bactéries? C. R. d. l. Soc. d. Biol. **87**, 687, 1922.
91. C. Pico: A propos de la note de Combiesco sur le phénomène de d'Herelle. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **87**, 826, 1922.
92. C. Pico: Autolyse microbienne du Bac. Anthracis sans intervention de l'hypothétique virus bactériophage. C. R. d. l. Soc. d.Biol. **87**, 836, 1922.
93. P. Fabry: Autolyse microbienne transmissible obtenu par antagonisme microbien. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **87**, 369, 1922.

94. O. Bail: Bakteriophage Wirkungen gegen Flexner- und Colibakteriën. Wien. Klin. Woch **34**, 1921.
95. R. Otto, H. Munter und W. Winkler: Beiträge zum d'Herelle'schen Phänomen. Zeitsch. f. Hyg. **96**, 130, 1922.
96. Appelmans et Wagemans: Bactériophages de diverses provenances. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **86**, 738, 1922.
97. J. Maisin: Les Bactériophages. Archiv. intern. d. Pharm et de Ther. **26**, 215, 1922.
98. J. Maisin: Les Bactériophages. Archiv. intern. d. Pharm. et de Ther. **27**, 87, 1922.
99. Bruynoghe et Appelmans: La neutralisation des Bactériophages de diverses provenances. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **87**, 96, 1922.
100. O. Bail und S. Okuda: Der Abbau lebender Bakteriën durch Bakteriophagen. Archiv. f. Hyg. **92**, 251, 1923.
101. O. Bail und T. Watanabe: Versuche über spec. Bakteriophagen-Wirkung. Wien. Klin. Woch. **35**, 362, 1922.
102. O. Bail: Elementarbakteriophagen des Shiga-bacillus, Wien. Klin. Woch. **35**, 722, 1922.
103. O. Bail: Beobachtungen an Colibakteriophagen. Med. Klin. **19**, 144, 1923.
104. Kraus e Gomez: Experiencias-sobre Bacteriophagia. Brazil Medicio p. 267, 1922 (zie no. 61).
105. K. Joetten: Über das sogenannte d'Herelle'sche Phänomen, Klin. Woch. **1**, 2181, 1922.
106. A. Gratia et B. Rhodes: Action des princ. lyt. sur les émulsions de Staph. vivants et de Staph. tués. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **89**, 1173, 1923.
107. D. Jaumain et Meulemans: Absorption du principe lytique par les microbes tués. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **87**, 362, 1923.
108. J. da Costa Cruz: Sur la nature du Bactériophage. C. R d. l. Soc. d. Biol. **89**, 759, 1923.
109. A. Saldanha, Phenomène de d'Herelle. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **86**, 623, 1922.
110. J. Bablet: Sur le principe bactériophage de d'Herelle. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **83**, 1322, 1920.
111. J Kabelick: Bacteriophagum intestinale. Biol. Listy. No. 3—4, 1922 (zie no. 61).
112. T. Okamoto: Untersuchungen über die Beziehungen des d'Herelle'schen Phänomens zum N-stoffwechsel der Bakteriën. Zeitsch. f. Immf. **42**, 161, 1925.
113. Maitland: Experiments employing a quantitative Method in a study of the d'Herelle phenomenon. Brit. Journ. of exp. Path. **3**, 173, 1922.

114. E. Lepper: Reproduction of Bacteriophage, when the sensitive organism is grown in a synthetic Medium. Brit. Journ. of exp. Path. **5**, 40, 1922.
115. P. Fabry et. J. v. Beneden: A propos de l'obtention de l'autolyse transmissible par antagonisme. C. R d. l. Soc. d. Biol. **90**, 109, 1924.
116. Yoshio Yasaki: Die Abhängigkeit der Eigenschaften des lyt. Agens d'Herelle's von der Verdünnung und vom Mediums. Zeitsch. f. Hyg. **102**, 554, 1924.
117. C. Zoeller: Action des rayons ultraviolets sur une souche de Bactériophage. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **89**, 860, 1923.
118. R. Doerr und G. Rose: Die Thermoresistenz des Bakteriophagen. Schweiz. Med. Woch. **54**, 10, 1924.
119. J. Bronfenbrenner and Ch. Korb: Effect of alcohol on the so-called bacteriophage of d'Herelle. Proc. Soc. f. Exp. Biol. a. Med. **21**, 177, 1924.
120. E. Zdansky: Über die Bedeutung der Salze für die übertragbaren Lysine (Bakteriophagen). Wien. Klin. Woch. **37**, 141, 1924.
121. A. Gratia: Influence de la réaction du milieu sur la lyse microbienne transmissible. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **84**, 275, 1921.
122. J. da Costa Cruz: L'influence du P_H. sur la lyse par le Bactériophage. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **90**, 878, 1924.
123. J. da Costa Cruz: Influencia dos electrolytos sobre a lyse pelo Bacteriophago. Brazil Medio **37**, 341, 1923. (zie no. 108).
124. J. da Costa Cruz: Sur l'influence des électrolytes dans la lyse par le Bactériophage. C. R. d. l. Soc de Biol. **90**, 236, 1924.
125. J. da Costa Cruz: Sur la nature du Bactériophage à propos d'une note de F. d'Herelle. C. R. d. l. Soc. de Biol. **90**, 694, 1924.
126. M. Lisbonne et L. Carrère: Influence des électrolytes sur la lyse microbienne transmissible. C. R. d. l. Soc. de Biol. **89**, 265, 1923.
127. Lisbonne et Carrère: Sur l'apparation spontanée du pouvoir lysogène dans les cultures pures. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **90**, 265, 1924.
128. P. Brutsaert: Influence des électrolytes sur le phenomène de d'Herelle. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **89**, 1175, 1923.
129. P. Brutsaert: Bacteriophaagstudies (Invloed der electrolyten) te Leuven. II B.
130. Y. Aheshov: Experimental studies on the Bacteriophage. Journ. of infect. Diseases **34**, 536, 1934.
131. M. Ciuca: Lyse transmissible en abscence d'électrolytes libres. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **90**, 521, 1924.
132. W. Borchardt: Biologische Beiträge zum d'Herelle'schen Phänomen. Zeitsch. f. Immf. **37**, 1, 1923.
133. A. Seiser: Untersuchungen über das Phänomen von d'Herelle. Archiv. f. Hyg. **92**. 251, 1923.

134. Otto und Munter: Weitere Untersuchungen zum d'Herelle'schen Phänomen. Zeitsch. f. Hyg. **100**, 402, 1923.
135. O. Nakamura: Die Hemmung der Bakteriophagenwirkung durch Gelatine. Archiv. f. Hyg. **92**, 61, 1913.
136. P. Brutsaert: Le Bactériophage dans les milieux gélatinés. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **90**, 1292, 1924.
137. P. Brutsaert: Invloed van gelatine. Bacteriophaagwerken te Leuven. 1923 II C.
138. P. Haudurov: Action de gélatine sur le phenomène de d'Herelle. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **90**, 1463, 1924.
139. J. de Necker: De l'adsorption du principe bactériophage par les colloïdes. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **87**, 1247, 1922.
140. P. Flu: Kunnen bacteriophagen door een 3% agargel diffundeeren? Tijdsch. v. vergl. geneesk. **10**, afl. 4, 1924.
141. W. Gohs: Eine neue Theorie der Bakteriophagenwirkung. I Experimentelle Beobachtungen über die Bakteriophagie. Zeitsch. f. Immf. **45**, 141, 1925.
142. W. Gohs: Eine neue Theorie der Bakteriophagenwirkung. II Theorie der Bakteriophagenwirkung Zeitsch. f. Immf. **45**, 269, 1925.
143. W. Gohs: Eine neue Theorie der Bakteriophagenwirkung und ihre Beziehung zu Immunität, Anaphylaxie und Verdauung. III. Zeitsch. f. Immf. **45**, 1925.
144 J. de Necker: De l'influence de la chaleur sur le principe bactériophage. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **86**, 736, 1922.
145. A. Lode: Hemmung und Bakteriophagenwirkung beim Bac. Pyocyaneus. Archiv. f. Hyg. **93**, 1923.
146. Mc. Leod and Govenlock: The production of bacteriocidines by micro-organisms. The Lancet p. 300, 1921.
147. D. Jaumain: Autolyse microbienne et tubes scellés. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **87**, 790, 1922.
148. E. Gildemeister und K. Herzberg: Über das d'Herelle'sche Phänomen. Centralbl. f. Bakt. **91**. H 3/4, 1924.
149. Ledingham: Discussion on the Nature of Bakteriophage. Brit. med. Journ. 1922.
150. Otto und Munter: Das Bakteriophage lysin. Zeitsch. f. Hyg. **98**, 302, 1922.
151. R. Brinkman und A. v. Szent-Györgyi: Studiën über die phys.-chem. Grundlagen der vitalen Permeabilität. Biochem. Zeitsch. **139**, 267, 1923.
152. F. d'Herelle et E. Pozerski: Action de la température sur le Bactériophage. C R. d. l. Soc. d. Biol. **85**, 1011, 1922.
153. T. Kabeshima: Sur un ferment d'immunité bactériolysant. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **83**, 471, 1920.

154. T. Kabeshima: Sur un ferment d'immunité bactériolysant. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **83**, 471, 1920.
155. A. Gratia et D. Jaumain: Dualité du principe lytique du Colibacille et du Staphylocoque. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **85**, 882, 1921.
156. Bruynoghe et Maisin: Essais de therapeutique au moyen du Bactériophage du Staphylocoque. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **85**, 1122, 1921.
157. P. Hauduroy: Influence du chauffage sur le bactériophage de d'Herelle. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **87**, 1089, 1922.
158. J. Tchang Kouo Ngen et J. Wagemans: Résistance des Bactériophages à la chaleur. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **87**, 1253, 1922.
159. J. Tchang Kouo Ngen et J. Wagemans: Résistance des Bactériophages à la chaleur. C. R. d. l. Soc. d. Biol. **88**, 303, 1923.
160. S. Okuda: Über Pyocyaneusbakteriophagen. Wien. Klin. Woch. **36**, 125, 1923.
161. S. Okuda: Pyocyaneusbakteriophagen. Archiv. f. Hyg. **92**, H. 2, 1923.
162. T. Watanabe: Desinfektionsversuche mit Bakteriophagen. Archiv. f. Hyg. **92**, 1, 1923.
163. L. Wolff et J. Janzen: Sur la virulence multiple du Bactériophage. Annales de l'Instit. Pasteur, **37**, 1064, 1923.
164. L. Wolff en J. Janzen: Bacteriophaagstudies III. Tijdschr. v. Geneesk. II, 147, 1923.
165. Otto in Handbuch von Kraus und Uhlenhuth **2**, 1300.
166. A. Werthemann: Das Verhalten der übertragbaren Lysine in der Zirkulation von Kalt- und Warmblütern. Archiv. f. Hyg. **91**, 255, 1922.

STELLINGEN.

I.

Bij de bacteriophage lysis is het oplossen een secundair verschijnsel.

II.

De (bacteriophage) lysis kan in vloeibare gelatine-houdende voedingsmedia, zelfs bij hooge gelatine-concentraties (20 %) bij 37° C. wèl tot stand komen.

III.

Het auricularis symptoom van MENDEL is niet pathognostisch voor meningitis.

IV.

Pijnen in den buik en in de lenden worden bij de vrouw slechts in beperkte mate veroorzaakt door objectieve veranderingen der genitaalorganen.

V.

De acute vergiftigingsverschijnselen, die bij het rooken (van sigaren, sigaretten, tabak) worden waargenomen, worden alleen veroorzaakt door de geadsorbeerde nicotine; koolmonoxyde en andere rookbestanddeelen zijn in te geringe concentraties aanwezig om acute vergiftigingsverschijnselen te doen optreden.